

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARSTITEADUSKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Freddy Lättekivi

Liposarkoomi genoomipiirkondade sekveneerimine

Bakalaureusetöö

Juhendajad teadur Ene Reimann

prof. Ants Kurg

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Geneetiline varieeruvus	5
1.2. Geneetilised variatsioonid ja vähkkasvajad	6
1.2.1. Ühenukleotiidsed variatsioonid ja vähkkasvajad	7
1.2.1.1. Põhjuslikud ühenukleotiidsed variatsioonid	8
1.2.1.2. Ühenukleotiidsed polümorfismid kui korrelatiivsed markerid.....	9
1.3. Liposarkoomid	10
1.3.1. Hästi-diferentseerunud liposarkoom ja dediferentseerunud liposarkoom.....	11
1.3.2. Ümarakuline/müksoidne liposarkoom	12
1.3.3. Pleomorfne liposarkoom	13
1.4. Vähkkasvajad ja sekveneerimine	14
1.5. Järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodid.....	15
1.5.1. Ion Torrent PGM™	15
1.5.2. Ion AmpliSeq™ Target Selection Technology	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjalid ja meetodid	17
2.2.1. Tartu Ülikooli eetikakomisjoni luba.	17
2.2.2. Patsiendi ja haigusjuhtumi iseloomustus	17
2.2.3. DNA eraldamine	18
2.2.4. Raamatukogu valmistamine ja sekveneerimine	18
2.2.5. Andmeanalüüs.....	19
2.3. Tulemused.....	20
2.4. Arutelu	21
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
KASUTATUD KIRJANDUS	30
LISAD	40
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	48

KASUTATUD LÜHENDID

ap - aluspaar

B-SIFT – *bi-directional sorting tolerant from intolerant* (algoritm)

CNV – *copy number variation*, koopiaarvu variatsioon

DDLPS – *dedifferentiated liposarcoma*, dediferentseerunud liposarkoom

ENCODE – *Encyclopedia of DNA Elements*

Gb – *giga base pairs*, miljard aluspaari

GWAS – *genome-wide association study*, ülegenoomne assotsiatsiooniuuring

Indel – insertioon või deletsioon

IVA – Ingenuity[®] Variant Analysis[™]

KT – kompuutertomograafia

Mb – *mega base pairs*, miljon aluspaari

MLPS – *myxoid liposarcoma*, müksoidne liposarkoom

MNV – *multiple nucleotide variation*, mitmenukleotiidne variatsioon

MRT – magnetresonantstomograafia

ncRNA – *non-coding RNA*, mittekodeeriv RNA

NGS – *next-generation sequencing*, järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodid

PET – positronemissioontomograafia

RCLPS – *round cell liposarcoma*, ümrarrakuline liposarkoom

SIFT – *sorting tolerant from intolerant* (algoritm)

SNP – *single nucleotide polymorphism*, ühenukleotiidne polümorfism

SNV – *single nucleotide variation*, ühenukleotiidne variatsioon

Tb – *tera base pairs*, trillion aluspaari

WDLPS – *well-differentiated liposarcoma*, hästi diferentseerunud liposarkoom

3'UTR – *3' untranslated region*, 3' mittetransleeritav regioon

SISSEJUHATUS

Liposarkoomid on haruldased pahaloomulised rasvkoe kasvaja, millede esinemissagedus on ligikaudu 1–2 juhtumit miljoni inimese kohta aastas. Eristatakse peamiselt kolme alamtüüpi: hästi-diferentseerunud/dediferentseerunud, ümarrakuline/müksoidne ja pleomorfne liposarkoom, mis erinevad nii neile iseloomulike mutatsioonide, histoloogia kui ka patoloogia poolest. Kuigi liposarkoomide puhul on hästi kirjeldatud neile omaseid kromosomaalseid ümberkorraldusi, amplifikatsioone ja deletsioone, on nendes kasvaja esinevaid ühenukleotiidilisi variatsioone (*single nucleotide variation*, SNV) ja väiksemahulisi insertioone ja deletsioone (indelid) uuritud minimaalselt.

Kuigi tegemist on äärmiselt väikeste mutatsioonidega, võivad SNV-d ja indelid otseselt mõjutada nii vähkkasvaja tekkimist kui ka nende edasist patogeneesi. Lisaks sellele võivad patoloogilist mõju mitte omavad mutatsioonid korreleeruda tegelike põhjuslike mutatsioonidega, ning omada seeläbi olulist prognostilist väärtust. Kaasaegsete sekveneerimismeetoditega on võimalik SNV-sid ja indeleid määrata suure täpsusega. Järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodite kiire arengu tulemusena on suuremahuliste sekveneerimistööde maksumus ning töömahukus oluliselt vähenenud, mis on toonud kaasa sekveneerimise laialdasema kasutamise nii teadustöös kui ka kliinilises praktikas.

Käesoleva töö eesmärk oli uuritava liposarkoomi võimalike põhjuslike ja patogeneesi mõjutavate geneetiliste variatsioonide tuvastamiseks rakendada meie uurimisgrupi poolt väljatöötatud vähipaneeli, mis katab vähkkasvaja puhul kliinilises praktikas tähtsust omavaid genoomi piirkondi. Antud uurimustöö viidi läbi Tartu Ülikooli arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditiini instituudi patofüsioloogia osakonnas.

Märksõnad: liposarkoom, sekveneerimine, Ion PGM, geneetilised variatsioonid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Geneetiline varieeruvus

Mutatsioonid DNA nukleotiidses järjestuses ja selle struktuuris põhjustavad variatsioone inimese ning ka teiste elusorganismide genoomides. Pärilikud ja somaatilised variatsioonid genotüübis põhjustavad erinevusi indiviidide fenotüübis, mõjutades nii antropomeetrilisi näitajaid, teatud haigustesse haigestumise riski ning ka seda, kuidas reageeritakse erinevatele keskkonnatingimustele. (Sachidanandam jt, 2001) Variatsioonid, mis toovad kaasa indiviidi parema kohastumuse keskkonnaga, tagavad valikulise eelise ning muutuvad populatsioonis enamlevinumaks. (Haraksingh ja Snyder, 2013) Variatsioonid võivad edasi päranduda nii individuaalselt kui ka spetsiifiliste kombinatsioonidena ehk haplotüüpidenä. (Cao jt, 2013) Geneetilistest variatsioonidest tulenevalt erinevad inimeste genoomid nukleotiidses järjestuses poolest 0,2–0,4% ulatuses. (Tishkoff ja Kidd, 2004)

Geneetilisi variatsioone saab liigitada lähtudes varieeruvate segmentide suurusest, nende loomusest ning asukohast genoomis. Iga variatsioon on ainulaadne oma asukoha ning nukleotiidses järjestuses poolest. Eristatakse seega ühenukleotiidilisi (*single nucleotide variant*, SNV) ja mitmenukleotiidilisi variatsioone (*multiple nucleotide variant*, MNV), lühikesi ehk mõne nukleotiidi pikkuseid insertsioone või deletsioone (indelid) ning struktuurseid varieeruvusi (joonis 1, lk 5). Struktuursete variatsioonide hulka kuuluvad pikemate DNA järjestuste deletsioonid, insertsioonid, amplifikatsioonid, inversioonid ja translokatsioonid. Ühtlasi ka koopiarvu variatsioonid (*copy-number variation*, CNV), mobiilsete elementide translokatsioonid ja kromosomaalsed aneuploidiad. (Haraksingh ja Snyder, 2013) Suurem osa variatsioonidest jääb DNA mittekodeerivatesse piirkondadesse. (Giampaoli jt, 2013)

Valdav enamus teadaolevaid SNV-sid, indeleid ja ka teisi väiksemahulisi geneetilisi variatsioone on koondatud dbSNP andmebaasi. (Sherry jt, 2001) dbSNP andmebaasi kõige uuem, 141. versioon sisaldab 62 387 983 inimese geneetilist variatsiooni, millest 43 737 321 on valideeritud. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) Selle andmebaasi täienemisse on oluliselt panustanud 1000 Genoomi Projekt, mille eesmärk on välja selgitada inimese genoomi varieeruvuse ulatus. (1000 Genomes Project Consortium jt, 2012)

Ühenukleotiidne variatsioon (SNV)	ATTGGCCTTAACCTCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACCTCCGATTATCAGGAT
Insertsioon või deletsioon (indel)	ATTGGCCTTAACCCGATCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACCC---CCGATTATCAGGAT
Mitmenukleotiidiline variatsioon (MNV)	ATTGGCCTTAACCCCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACAGTCGATTATCAGGAT
Inversioon	ATTGGCCTTAACCCCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTCGGGGGTTATTATCAGGAT
Koopiaarvu variatsioon (CNV)	ATTGGCCTTAGGCCTTAACCCCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTA-----ACCTCCGATTATCAGGAT

Joonis 1. Näited geneetilistest variatsioonidest. Kohandatud Frazer, K. A. jt 2009. a artiklist. (Frazer jt, 2009)

1.2. Geneetilised variatsioonid ja vähkkasvajad

Vähk on geneetiline haigus, mida põhjustavad geeniekspressiooni muutuses kajastuvad mutatsioonid SNV-dest kuni suuremahuliste deletsioonide, insertsioonide, amplifikatsioonide ja struktuursete ümberkorraldusteni. (Kamalakaran jt, 2013) Vähkkasvajate teket võivad põhjustada mutatsioonid geenides, mis on seotud näiteks DNA reparatsiooni, mutageenide metabolismi või rakutsükli ja apoptoosi kontrolliga. (Savas ja Liu, 2009)

Vähitekke protsessis ehk onkogeneesis on kesksel kohal mutatsioonid, mis toovad kaasa onkogeenide ekspressioonitaseme tõusu või nende konstitutiivse ekspressiooni, ning mutatsioonid, mis põhjustavad tuumor-supressor geenide ekspressiooni vähenemist või täielikku inaktiveerumist. (Chari jt, 2010) Laialdaselt on uuritud mutatsioone näiteks *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* ja *TP53* tuumor-supressor geenides. (Savas ja Liu, 2009*) Oluliste muutusteni geeniekspressioonis viivad tavaliselt kas inaktivatsioonid, mis hõlmavad mõlemaid alleele, või mitmekordsed geenide koopiaarvu suurenemised. (Chari jt, 2010) Struktuursete ümberkorraldustega võib muuhulgas kaasned ka onkogeensete liitgeenide teke. Näiteks liposarkoomide puhul on kirjeldatud erinevate *FUS-DDIT3* ja *EWSR1-DDIT3* liitgeenide teket. (Dal Cin jt, 1997; Rabbitts jt, 1993)

Geneetilised variatsioonid võivad mõjutada ka eelsoodumust kasvaja tekkeks, selle allumist ravile ning patsiendi elumust. (Savage ja Chanock, 2006) Kusjuures, määravaks saavad nii pärilikud kui ka somaatilised mutatsioonid. (Savas ja Liu, 2009)

Vähkkasvajad on küllaltki heterogeensed ning see tuleneb vähemalt osaliselt inimese genoomi varieeruvusest. Seda seost illustreerib asjaolu, et erinevates populatsioonides võib erinevat tüüpi vähkkasvajaid esineda väga erinevate sagedustega. (Savage ja Chanock, 2006) Peale genotüübiliste erinevuste mõjutavad kasvajate heterogeensust ka varieeruvad keskkonnafaktorid. (Savas ja Liu, 2009) Kuigi enamasti on igale kasvaja tüübile omased kindlad mutatsioonid, on leitud, et osad mutatsioonid, mida varem peeti koespetsiifilisteks, ei pruugi seda siiski olla. (Kamalakaran jt, 2013) Näiteks algselt oli *ERBB2* geeni amplifikatsioon kirjeldatud vaid rinnavähkide puhul, kuid hilisemalt on tuvastatud nende esinemine ka maovähkide korral. (Kamalakaran jt, 2013; Barros-Silva jt, 2009)

Üldpilti vähkkasvajaid põhjustavatest mutatsioonidest muudavad keerulisemaks ka variatsioonid, mis esinevad populatsioonis äärmiselt madalatel sagedustel, kuid võivad olla kasvaja-spetsiifilised või põhjustavad kasvaja tekke vaid kombineerituna teiste geneetiliste variatsioonidega. (Chari jt, 2010) On täheldatud, et paljudes vähkkasvajates on haruldased pärilikud mutatsioonid enam esindatud kui somaatilised mutatsioonid. (Stratton jt, 2009) Pärilikud mutatsioonid võivad mõjutada raku metabolismi ning DNA stabiilsust, kuid ei pruugi ilma täiendavate somaatiliste mutatsioonideta olla piisavad vähkkasvaja tekkeks. (Bailmain jt, 2003) Seetõttu on pärilikke geneetilisi variatsioone võimalik kasutada kasvaja tekkimise eelsoodumuse, erinevate ravimeetodite efektiivsuse ning haiguse kulgemise prognoosimiseks. (Savas ja Liu, 2009)

1.2.1. Ühenukleotiidsed variatsioonid ja vähkkasvajad

Geneetilistest variatsioonidest on inimese genoomis kõige enam esindatud SNV-d ning need on ka vähiuuringutes laialdast kasutust leidnud. (Savas ja Liu, 2009*) SNV-d on ühealuspaarilised muutused genoomses järjestuses. Tegemist on asendusmutatsioonidega, mille korral summaarne nukleotiidide arv ei muutu. (Haraksingh ja Snyder, 2013) Kui SNV variantne alleel esineb populatsioonis vähemalt üheprotsendilise sagedusega, on tegemist ühenukleotiidses polümorfismiga (*single nucleotide polymorphism*, SNP). (Vignal jt, 2002) Teadaolevate SNP-de arv on viimase viie aasta jooksul hüppeliselt kasvanud ning need võivad kujuneda olulisteks geneetilisteks markeriteks tervisliku seisundi hindamisel. (Giampaoli jt, 2013)

Leidub erinevaid andmeid SNP-de esinemissagedusest inimese genoomis. 2001. aastal läbiviidud uurimuse põhjal järeldati, et inimese genoomis leidub üks SNP iga 1900 aluspaari (ap) kohta. (Sachidanandam jt, 2001) 2012. aastal avaldatud 1000 Genoomi Projekti andmete

kohaselt leidus igas uuritud individuaalses genoomis ligikaudu 3,6–3,8 miljonit SNP-d ehk ligikaudu üks SNP iga 900 ap kohta. (1000 Genomes Project Consortium jt, 2012)

SNP on sisuliselt kahe erineva nukleotiidi esinemine erinevates genoomides samas positsioonis. On võimalik ka nelja erineva nukleotiidi esinemine, kuid SNP-d esinevad valdavalt kahealleelsetena. Seda ühe põhjusena seetõttu, et transitsioone põhjustavad mutatsioonid toimuvad sagedamini kui transversioone põhjustavad mutatsioonid. Teise põhjusena võib nimetada asjaolu, et nukleotiidsed asendused toimuvad madalal sagedusel. Seega, on väga väike tõenäosus, et samas positsioonis toimuvad kaks sõltumatut mutatsiooni. (Vignal jt, 2002) Nukleotiidsete asenduste sageduseks inimese puhul arvatakse olevat ligikaudu $2,5 \times 10^{-8}$ mutatsiooni nukleotiidi kohta põlvkonnas. (Nachman ja Crowell, 2000)

Geneetilistes uuringutes rakendatakse SNP-sid kas geneetiliste markeritena, mille korral nende tegelik funktsionaalne mõju ei ole oluline, või geneetiliste faktoritena, millede mõju geeni ekspressioonile või funktsioonile on teada. (Savas ja Liu, 2009*) Valdava enamuse SNV-de puhul ei ole nende funktsionaalsed tagajärjed teada ning on tõenäoline, et enamikel SNV-del ei olegi funktsionaalseid tagajärgi. (Chanock, 2001)

1.2.1.1. Põhjuslikud ühenukleotiidsed variatsioonid

Põhjuslikud SNV-d omavad otsest bioloogilist mõju, mis võib avalduda kas muutuste tõttu kodeerivas järjestuses, mille tulemusena saab mõjutatud ekspresseeritud produkti funktsionaalsus, või muutuste tõttu reguleeritavates elementides, mis avaldavad mõju geeni ekspressioonile ja/või selle reguleeritavusele. (Haraksingh ja Snyder, 2013)

Juhul kui kodeeritava produkti struktuur ja funktsioonid on hästi teada, on võimalik tuletada ka selles esineva SNV alleelide bioloogilist mõju. Kodeerivates järjestustes võivad SNV-d põhjustada sünonüümseid või mittesünonüümseid asendusi. Sünonüümsed asendused ei põhjusta mõjutatud koodonile vastava aminohappe muutust ning kodeeritava valgu aminohappeline järjestus jääb samaks. Mittesünonüümsed asendused võivad olla *missense* või *nonsense* asendused. *Missense* asendus põhjustab muutuse kodeeritava valgu aminohappelises järjestuses. *Nonsense* asenduse tõttu tekib aga kodeerivasse DNA järjestusse enneaegne stop-koodon, mille tagajärjel ekspresseeritakse kas lühendatud peptiidi või suunatakse vastav mRNA lagundamisele. Mõlemal juhul funktsioneerivat lõpp-produkti ei teki. (Haraksingh ja Snyder, 2013) Näiteks tuumor-supressor geeni *PTEN* *missense* ja *nonsense* mutatsioone on leitud glioomi ehk gliiarakkudest alguse saanud kasvaja rakkudest. (Steck jt, 1997)

Vastavalt reguleerijatele piirkondadele, millede piiresse SNV-d jäävad, on võimalik tuletada ka nende SNV-de tagajärg raku funktsioonidele. (Savas ja Liu, 2009*) Näiteks, sarkoomide puhul esineb tihti T > G nukleotiidsed asendused *MDM2* geeni promootoris (SNP309, rs2279744), mis põhjustab *MDM2* ekspressioonitaseme suurenemise, mis omakorda inhibeerib tuumor-supressor geeni *TP53* ekspressiooni. (Bond jt, 2004; Ito jt, 2011)

On samuti võimalik, et SNV-d, millel esialgu mingit nähtavat mõju geeniekspressioonile ei ole, avaldavad nähtavat mõju alles pärast pikaajalist geeni produkti minimaalset üle- või alaproduktsiooni akumulierumist. Samuti võib mõju avalduda vaid kombineerituna teiste variatsioonide või spetsiifiliste keskkonnateguritega. (Savage ja Chanock, 2006) Näiteks polümorfismid kartsinogeenide metabolismiga seotud geenides mõjutavad riski tubaka tarbimisega seotud vähkkasvajate tekkeks. (Taioli, 2008)

Põhjuslike variatsioonide tuvastamiseks on rakendatud kasvaja ning terve koest eraldatud ja sekveneeritud DNA võrdlevat analüüsi. Seda illustreerib Ley, T. J. jt 2008. aastal läbiviidud uurimus, mille käigus võrreldi akuutset müeloidset leukeemiat põdeva patsiendi kasvaja- ning terve koe genome. Kokku tuvastati 10 mittesünonüümset somaatilist mutatsiooni, millest kaks olid selle kasvaja puhul ka eelnevalt kirjeldatud indelid ning kaheksa olid esmakordselt kirjeldatud SNV-d. Tuvastatud SNV-dest neli asusid teadaolevates vähkkasvajate patogeneesis seotud geenides. (Ley jt, 2008)

1.2.1.2. Ühenukleotiidsed polümorfismid kui korrelatiivsed markerid

SNP-d on kõige enam leidnud rakendust geneetiliste markeritena ülegenoomsetel assotsiatsiooniuuringutel (*genome-wide association study*, GWAS). (Ku jt, 2010) Erinevate GWAS uuringute põhjal on järeldatud, et ligikaudu 88% fenotüübiga korreleeruvatest SNP-dest asuvad intronites ja geenidevahelistes piirkondades. *Missense* asendused moodustavad fenotüübiga korreleeruvatest SNP-dest vaid 2%. (Hindorff jt, 2009) Kuna SNP-d on genoomis väga levinud, esinevad need tihti aheldatuse tasakaalustamatuses (*linkage disequilibrium*) seni avastamata tegelike põhjuslike mutatsioonidega ning päranduvad seetõttu koos. (Savas ja Liu, 2009*) See tähendab, et SNP-sid on võimalik rakendada markeritena, mille kaudu on tuvastatavad haplotüübid, mis korreleeruvad uuritavate fenotüüpidega. (Savas ja Liu, 2009) Näiteks, 8. kromosoomi pikemas õlas on tuvastatud piirkond (8q24), milles asuvate SNP-de variantsed alleelid korreleeruvad eelsoodumusega haigestuda eesnäärme vähki. (Al Olama jt, 2009)

SNP-de rakendamine geneetiliste markeritena võimaldab ka genoomi piirkondade või spetsiifiliste geneetiliste variatsioonide tuvastamist, mis on kasvaja tekkega põhjuslikult seotud. Samas on üleminek korrelatiivsetest seostest põhjuslike seosteni äärmisel töömahukas ja keerukas ettevõtmine. (Matullo jt, 2013) Lisaks on SNP-sid kui markereid võimalik kasutada ka geenide koopiaarvu variatsioonide ning alleelsete ebanormaalsuste tuvastamiseks. (Chari jt, 2010)

1.3. Liposarkoomid

Liposarkoomid on haruldased pahaloolumulised rasvkoe kasvajakud, millede esinemissagedus on ligikaudu 1–2 juhtumit miljoni inimese kohta aastas. (Gustafson jt, 1993) Sellegi poolest on liposarkoom kõige enam esinev pehmete kudede sarkoom, mis moodustab ligikaudu 20% kõikidest esinevatest mesenhümaalsetest pahaloolumulistest kasvajatest. (Dei Tos, 2000) Liposarkoomid jagunevad kolme põhilise alamtüübi vahel: hästi-diferentseerunud/dediferentseerunud liposarkoomid, ümarrakulised/müksoidsed liposarkoomid ja pleomorfsed liposarkoomid. (Kindblom, 2006)

Liposarkoomi mõju elumusele sõltub suuresti nii selle alamtüübist kui ka kasvaja anatoomilisest asukohast ja suurusest. Müksoidsed ja hästi-diferentseerunud liposarkoomid on diferentseerunud ning vähe agressiivsed. Seevastu ümarrakulised, dediferentseerunud ja pleomorfsed liposarkoomid on dediferentseerunud ning agressiivsed kasvajakud, mis ka metastaseeruvad suurema tõenäosusega. Kõige kehvema väljavaatega elumusele on kõhukelme-taguses ruumis esinevad liposarkoomid.. (Dei Tos, 2000) Ravimeetoditest on põhilised kasvaja kirurgiline eemaldamine ja kiiritusravi. Keemiaravi suhtes on tundlikud vaid vähesed alamtüübid. (Conyers jt, 2011)

Liposarkoomide puhul on hästi kirjeldatud erinevad spetsiifilised struktuursed mutatsioonid, sh amplifikatsioonid ja deletsioonid. (Dal Cin jt, 1993; Taylor jt, 2008) Väikemahulistest mutatsioonidest on kirjeldatud näiteks ühenukleotiidsete indelide esinemist *PIK3CA*, *TP53* ja *PTEN* geenides. (Barretina jt, 2010) SNV-de esinemist liposarkoomides on kirjeldatud minimaalselt. Teada on näiteks variatsiooni SNP309 (rs2279744) sagedasem esinemine liposarkoomides. (Ito jt, 2011)

1.3.1. Hästi-diferentseerunud liposarkoom ja dediferentseerunud liposarkoom

Hästi-diferentseerunud liposarkoom (*well-differentiated liposarcoma*, WDLPS) moodustab ligikaudu 40–45% liposarkoomi juhtudest, ning tekib enamasti kõhukelme-taguses ruumis või jäsemete rasvkoos. Sagedasemad anotoomilised piirkonnad on ka keskseinand ja viimajuhad. WDLPS-i lokaalse taastumise tõenäosus pärast kasvaja eemaldamist või selle rakkude surmamist on 30%, kuid kauglevikut on täheldatud vaid üksikutel juhtudel. (Dei Tos, 2000)



Joonis 2. WDLPS metafaasi kromosoomid. Pildil on näha iseloomulikud rõngaskromosoom ja pikk markerkromosoom. Kohandatud Sandberg, A. A. 2004. a artiklist. (Sandberg, 2004)

Põhiliselt jagatakse WDLPS alamtüübid kolmeks: adipotsüütne, skleroosne ja põletikuline liposarkoom (Fletcher jt, 2002). Adipotsüütse liposarkoomi

moodustavad erinevas suuruses diferentseerunud adipotsüüdid ehk rasvarakud ning väiksemas ulatuses lipoplastid. Skleroosne liposarkoom koondab peamiselt kõhukelme-taguseid ning paratestikulaarseid liposarkoome, mida iseloomustavad stroomarakkude esinemine ja kollageenne rakuväline maatriks. Põletikulise liposarkoomi omapära seisneb mitmetuumaliste stroomarakkude ning erineva fenotüübiga, kuid peamiselt B- ja T-, lümfotsüütide esinemises. (Dei Tos, 2000)

WDLPS tunnuseks on rõngaskromosoomid või pikad markerkromosoomid, mis on moodustunud peamiselt 12q13-15 regioonist pärit järjestuste amplifitseerumisel (joonis 2). (Dal Cin jt, 1993) 12q13-15 regioonist pärit amplifitseeritud järjestustesse kuuluvad näiteks *MDM2*, *CDK4*, ja *HMGA2* onkogeenid. (Pedeutour, 1999) *MDM2* amplifikatsioon ja üleekspressioon on WDLPS-i, ja ka dediferentseerunud liposarkoomi, üks olulisemaid omadusi. (Stiller jt, 2013) Ka *CDK4* geeni, mis osaleb rakutsükli regulatsioonis, üleekspressioon esineb enam kui 90% juhtudest. (Dei Tos jt, 2000; Binh jt, 2005) Fedele, M. jt poolt on fibroblastide koekultuuris näidatud, et *HMGA2* geeni 3' lühendatud (*truncated*) variantide ekspressioon põhjustab rakkude transformatsiooni. (Fedele jt, 1998)

Dediferentseerunud liposarkoomide (*dedifferentiated liposarcoma*, DDLPS) alla liigitakse liposarkoomid, mille puhul on märgata mittelipogeenseid ehk dediferentseerunud adipotsüüte. DDLPS saab alguse WDLPS dediferentseerumisest, ning on selle agressiivsem vorm. Erinevalt WDLPS-st, on DDLPS-il 15-20% tõenäosus metastaseeruda, kuid vähenenud elumusega seostatakse pigem kasvaja mitmekordset lokaalset taastumist kui kauglevikut. (Dei Tos, 2000) Sellegi poolest on DDLPS reeglina parema kliinilise väljavaatega kui ülejäänud dediferentseerunud pleomorfseid sarkoomid. (McCormick jt, 1994) Enamasti toimub rakkude dediferentseerumine esialgses kasvajakoldes, kuid 10% juhtudest võib *de novo* DDLPS tekkida eemaldatud WDLPS asemele. (Dei Tos, 2000)

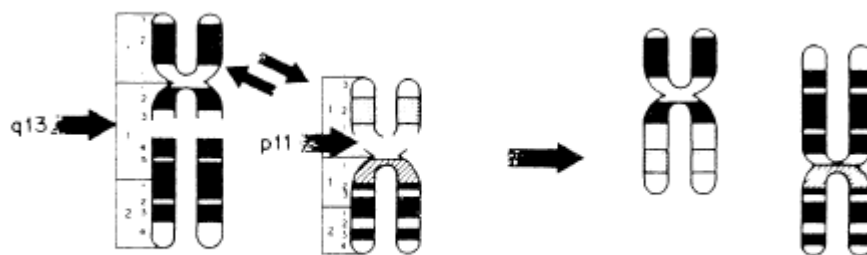
Kuna DDLPS on arenenud WDLPS-st, siis on ka selle tunnuseks 12q13-15 regioonist tekkinud rõngas- ja markerkromosoomid. (Fletcher jt, 2002) DDLPS puhul on leitud, et *MDM2* koopiaarv ja ekspressioonitase veel enam suurenenud kui WDLPS-s. (Dei Tos jt, 1997) Dediferentseerumise protsessiga on seostatud ka täiendavad mutatsioone geenis *TP53*. (Pilotti jt, 1997)

1.3.2. Ümarrakuline/müksoidne liposarkoom

Ümarrakuline/müksoidne liposarkoom moodustab ligikaudu 30–35% liposarkoomidest (Dei Tos, 2000) ning 10% täiskasvanutel esinevatest pehmete kudede sarkoomidest (Conyers jt, 2011). Ümarrakuline/müksoidne liposarkoom moodustub enamasti jäsemete, eriti reie, rasvkoos, kuid erandlikel juhtudel ka kõhukelme-taguses ruumis. Ümarrakuline liposarkoom (*round cell liposarcoma*, RCLPS) ja müksoidne liposarkoom (*myxoid liposarcoma*, MLPS) moodustavad ühe alamtüübi kaks äärmust, millele vastavalt on MLPS paremini diferentseerunud ning RCLPS dediferentseerunud ja seega agressiivsem äärmus. MLPS puhul on elumus 5 aastat pärast esmast avastamist 70%, kuid RCLPS korral kahaneb see 20%-le. (Dei Tos, 2000) RCLPS-i iseloomustab oluliselt suurenenud risk metastaseeruda. (Fletcher jt, 2002)

RCLPS/MLPS tunnusteks on väikemõõdulised käävrakud ja lipoblastid, mis esinevad müksoidses rakuvaheaines. Kui suurenenud ja seetõttu ümarate mittelipogeensete rakkude kogumike osahulk kasvajas on alla 5% või üle 80%, on tegemist vastavalt MLPS või RCLPS vormiga. Kui hüpertsellulaarsete rakkude osahulk kasvajas jääb 5-80% piiresse, on tegemist vahepealse RCLPS/MLPS vormiga. Dediferentseerunud ümarrakkude kogumike osahulk on seega oluline prognostiline faktor. (Dei Tos, 2000)

RCLPS/MLPS-e iseloomustab enamasti translokatsioon (t(12;16)(q13;p11), mille korral on 12. kromosoomi pikemas õlas paiknev *DDIT3* (*DNA-damage-inducible transcript 3*) geen ühinenud 16. kromosoomi lühemas õlas paikneva *FUS* (*fused in sarcoma*) geeniga (joonis 3). (Rabbitts, 1993) Harvemal juhul võib liitgeen olla tekkinud *DDIT3* geeni ja 22. kromosoomi pikemas õlas paikneva *EWSR1* (*Ewing sarcoma RNA-binding protein 1*) geeni liitumisel. (Dal Cin jt, 1997) Conyers, R. jt ülevaatliku artikli valmimise ajal oli teada 11 erinevat *FUS-DDIT3* ja 4 erinevat *EWSR1-DDIT3* liitgeeni, mis võivad põhjustada rasvarakkude diferentseerumisprotsessi häirumist (Conyers jt, 2011), kuid teadaolevalt ei mõjuta erinevad liitgeenide variandid kasvaja agressiivsust või ravile allumist (Antonescu jt, 2001). *FUS* ja *EWSR1* kuuluvad RNA-ga seonduvate valkude perekonda FET, mille liikmed osalevad transkriptsiooni regulatsioonis. (Bertolotti jt, 1996) *DDIT3* geeni produkt osaleb apoptoosirajas ning rasvarakkude diferentseerumise regulatsioonis. (Batchvarova jt, 1995)



Joonis 3. (t(12;16)(q13;p11) translokatsiooni kujutav skeem. (Sandberg, 2004)

RCLPS/MLPS puhul on tuvastatud PI3K/Akt raja üleaktiivsiooni, ning seda on seostatud üleminekuga agressiivsemasse ümarrakulisse vormi. PI3K/Akt raja üleaktiivsiooni võivad põhjustada mutatsioonid *PIK3CA* geenis, puudulik *PTEN* ekspressioon ja liigne *IGFRI* ekspressioon. (Demicco jt, 2011) PI3K/Akt raja üleaktiivatsioon toob läbi mitmete mehhanismide kaasa apoptoosi inhibeerimise ning rakkude proliferatsiooni aktiveerimise. (Vara jt, 2004)

1.3.3. Pleomorfne liposarkoom

Tegemist on kõige haruldasema liposarkoomi alamtüübiga, mis moodustab vaid 5% liposarkoomidest. (Ghadimi jt, 2011) Pleomorfne liposarkoom (*pleomorphic liposarcoma*,

PLPS) areneb enamasti kõrges vanuses ning anatoomilistest piirkondadest üldjuhul jäsemetes, kuid ka rindkeres ning kõhukelme-taguses ruumis. PLPS on morfoloogiliselt käävrakuline või pleomorfne, ning seda iseloomustab üksikute nii ühe kui ka mitme vakuooliga lipoplastide esinemine. (Dei Tos, 2000)

PLPS puhul on sagedamini esinevatest mutatsioonidest kirjeldatud 13q14.2–q14.3 deletsiooni, mis hõlmab ka tuumor-supressor geeni *RBI* (Taylor jt, 2008), ja erinevaid ühenukleotiidsed indeleid *TP53* geenis (Barretina jt, 2010). Lisaks sellele on kirjeldatud ka mitmete erinevate kromosoomipiirkondade deletsioone ja amplifikatsioone. (Mertens jt, 1998; Idbaih jt, 2005) PLPS-id on mutatsioonide poolest väga mitmekesised ning erinevalt WDLPS/DDLPs ja RCLPS/MLPS-st antud alamtüübi puhul sarnaseid omapäraseid mutatsioone kirjeldatud ei ole.

1.4. Vähkkasvajad ja sekveneerimine

Kümme aastat tagasi põhinesid patoloogiatega seotud genoomsed uuringud peamiselt PCR analüüsidel ning lühikeste DNA fragmentide sekveneerimisel Sangeri meetodil. Sellele järgnes DNA kiipide kasutamine. (Giampaoli jt, 2013) Järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodid (NGS, *next generation sequencing*) on viimastel aastatel jõudsalt arenenud ning on välja vahetamas eelnevaid suure läbilaskevõimega meetodeid, näiteks DNA kiipe. (Kamalakaran jt, 2013) NGS meetodid on toonud kaasa olulise edasiminekuga genoomsetes uuringutes võimaldades suuremahulisi sekveneerimisi võrdlemisi madalate kulude ning väikese töömahuga. (Liu jt, 2012)

Vähkkasvajate tekkimise põhjused peituvad genoomis ning seetõttu on sekveneerimine vähkkasvajate analüüsil olulisel kohal. (International Cancer Genome Consortium jt, 2010) Kasvaja genoomi sekveneerimine võimaldab saada teavet nii üksikute nukleotiidide tasemel toimunud mutatsioonidest, geeni koopiarvu muutustest kui ka kromosomaalsetest ümberkorraldustest. Transkriptoomide sekveneerimine annab ülevaate ekspresseeruvatest geenidest ning võimaldab tuvastada liitgeenide teket. NGS meetodid võimaldavad tervete genoomide sekveneerimist mitmekümnekordse kattuvusega, mistõttu on tuvastatavad ka haruldased geneetilised variatsioonid. (Kamalakaran jt, 2013) Kasvaja genoomi ning sama indiviidi normaalse genoomi sekveneerimine ja võrdlemine võib viia uute mutatsioonide tuvastamiseni ning ka võimalike kasvaja tekkepõhjuste väljaselgitamiseni. (Ley jt, 2008)

1.5. Järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodid

Järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodid võimaldavad oluliselt suurema mahu, täpsuse ja kiirusega sekveneerimist kui esimese põlvkonna meetodid, nagu näiteks Sangeri meetod. (Pavlopoulos jt, 2013) Kõige levinumad NGS süsteemid on (1) Roche 454, mis põhineb pürosekveneerimisel ehk nukleotiidi liitmisel eralduva pürofosfaadi tuvastamisel; (2) AB SOLiD™, mis raknedab DNA ligaasi ning tuvastab korraga kaks matriitsahelaga komplementaarset aluspaari iga nelja aluspaari järel; (3) Illumina GA/HiSeq™, mis põhineb komplementaarse ahela sünteesil liidetavate nukleotiidide tuvastamisel; (4) kompaktsamad ning väiksema läbilaskevõimega süsteemid: Ion PGM™ ja MiSeq™. (Liu jt, 2012)

1.5.1. Ion Torrent PGM™

Ion Torrent PGM™ (*Personal Genome Machine*) jõudis turule 2010. aastal ning seda turustab ettevõtte Thermo Fisher Scientific. Antud platvorm on loodud kasutamaks eelkõige väiksemates laborites ning kliinilises praktikas. Ion PGM™ põhineb pooljuht-sekveneerimisel, mille puhul polümeraasi poolt matriitsahelaga komplementaarse nukleotiidi liitmisel eralduvat prootonit tuvastatakse pH muutuse kaudu. (Liu jt, 2012) Sekveneerimine toimub kiipidel, millel asetsevate mõnemikromeetrise läbimõõduga kaevude põhjas on sensorid, mis võimaldavad pH muutuse registreerimist pinge muutusena. Igasse kaevu mahub vaid üks akrüülamiid kerake, mille pind on kaetud sekveneeritava DNA fragmendi kloonidega. (Rothberg jt, 2011)

Võrreldes AB SOLiD™ ja Illumina HiSeq™ süsteemidega, ei võimalda Ion PGM™ süsteem terve inimese genoomi, eksoomi ega transkriptoomi sekveneerimist, sest ka kõige suurema kaevude arvuga kiip suudab ühe töötükliga sekveneerida vaid 2 Gb (*giga base pairs*, miljard aluspaari). AB SOLiD™ 5500 Wildfire (W) ja Illumina HiSeq™ 2500 võimaldavad ühe töötükliga sekveneerida vastavalt ligikaudu 120 Gb ja 1 Tb (*tera base pairs*, trillion aluspaari). Kui AB SOLiD™ 5500 W ja Illumina HiSeq™ 2500 puhul kestab töötükk vastavalt 10 ja 6 päeva, siis Ion PGM™ puhul olenevalt kiibist vaid 1,5 kuni 4,5 tundi, millele lisandub ettevalmistustele kuluv 6 tundi. Ion PGM™ puhul on aga sekveneerimise hind 1 Gb kohta oluliselt kõrgem kui AB SOLiD™ ja Illumina HiSeq™ süsteemidel. (www.allseq.com)

1.5.2. Ion AmpliSeq™ Target Selection Technology

Ion AmpliSeq™ Target Selection Technology võimaldab huvipakkuvate genoomi piirkondade sekveneerimist, rakendades raamatukogu valmistamisel *multiplex* PCR meetodit ning tuhandetest praimerite paaridest koosnevaid paneele. Life Technologies™ on turule toonud erinevad praimerite paneelid, mis võimaldavad sekveneerida vähkkasvajate või pärilike haigustega seotud genoomi piirkondi. Saadaval on kaks erinevat vähipaneeli: Ion AmpliSeq™ Cancer HotSpot Panel, mis katab põhjalikumalt kõige enam vähkkasvajates muteerunud geene, ning Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel, mis katab üle 400 erineva onkogeeni ja tuumor-supressor geeni eksoneid. Lisaks genoomse DNA amplifitseerimisele turustatakse ka paneele RNA järjestuste amplifitseerimiseks, mis võimaldab lisaks sekveneerimisele hinnata ka geenide ekspressioonitaset. (www.lifetechnologies.com)

Lisaks sellele pakutakse ka võimalust tellida paneele kliendi poolt valitud piirkondade sekveneerimiseks (Ion AmpliSeq™ Custom Panels) tagades, et vähemalt 85% soovitud piirkondadest on komplekteeritava paneeli poolt kaetud. Ion AmpliSeq™ Custom Panels'ga on võimalik katta kuni 1 Mb (*mega base pairs*, miljon aluspaari) huvipakkuvaid järjestusi. (www.lifetechnologies.com)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud uurimustöö eesmärgiks oli meie uurimisgrupi poolt kasvajate uurimiseks väljatöötatud Ion AmpliSeq™ Custom Panels'i abil leida liposarkoomi koest nii somaatilisi kui ka pärilikke geneetilisi variatsioone, mis võiks aidata seletada selle vähitüübi tekkepõhjuseid ja patogeneesi. Selleks eraldati ja sekveneeriti DNA ühe patsiendi liposarkoomi koest ja tervest rasvkoest. Sekveneerimise tulemuste analüüsimiseks kasutati Ingenuity® Variant Analysis™ veebirakendust, et leida võimalikke seoseid väikeste indelide ja SNV-de ning liposarkoomi vahel.

2.2. Materjalid ja meetodid

2.2.1. Tartu Ülikooli eetikakomisjoni luba.

Tartu Ülikooli eetikakomisjon on andnud meie töögrupile loa kaasasündinud ja omandatud luukoe haiguste uurimiseks. Antud luba kattis ka käesoleva töö raames uuritud proove. Uurimisalased proovid koguti koostöös Tartu Ülikooli Kliinikumiga ja uuringus osalenud isik kirjutas alla vastavale nõusolekuvormile.

2.2.2. Patsiendi ja haigusjuhtumi iseloomustus

Patsient, 41-aastane meesterahvas, pöördus esmalt arsti poole moodustise tõttu vasaku põlve piirkonnas. Vasaku põlve piirkonnast eemaldati kohalikku tuimestust kasutades limaja moodustisega ümbritsetud plastmassitükk. Kuu aega hiljem teostati järgnevalt diagnoositud ganglioni avamine. Sellest kolm nädalat hiljem tuvastati vasaku põlve eespinnal valutut ja pehme konsistentsiga kasvaja, mis oli mõõtmetega 4x5 cm ning allasetsevate kudede suhtes liitunud. Järgnevalt eemaldati 3x4x5 cm suurune sagarlikulise struktuuriga pehme, pindmisele lihase kirmele ja sääreluu luuümbrisele kinnitunud kasvaja koos nahanekroosiga. Histoloogiliselt diagnoositi kasvajakas G2 pT2 liposarkoom (G2 – keskmiselt diferentseerunud; pT2 – kasvaja läbimõõt on suurem kui 5 cm. (www.cancer.gov)).

Mõne nädala möödudes pöördus patsient korduvalt arsti poole eelnevalt opereeritud piirkonna valu ning deformatsiooni tõttu, misjärel suunati patsient onkokiirurgi konsultatsioonile. Lahti läinud ning nekrotiseerunud operatsioonihaava alt tuvastati müksoidne kasvaja, millest võeti

korduvalt biopsiad. Histoloogiliselt diagnoositi eelnevale analoogne kasvaja ehk taastunud liposarkoom. MRT-uuringu (magnetresonantstomograafia) tulemusena tuvastati liposarkoomile vastav kasvajamass vasaku sääre piirkonnas, mis paiknes peamiselt subkutaanselt, kuid kesk- ja alaosas ka intramuskulaarselt, ning oli tihedas kontaktis sääreluu luuümbrisega. Kasvaja maksimaalmõõtmeks sagitaalpinnas oli 18 cm. Täiendavalt läbiviidud KT- (kompuutertomograafia) ja PET-uuringute (positronemissioontomograafia) tulemusena metastase ei tuvastatud. Teostati vasaku reie amputatsioon, millest pärinevad ka käesolevas töös DNA eraldamiseks kasutatud koed.

2.2.3. DNA eraldamine

Liposarkoomi ja terve rasvkoe genoomne DNA eraldati vastavalt 40 mg kasvajakoele ning 97 mg rasvkoele. DNA eraldamiseks kasutati kombineeritud FastPrep[®]-24 süsteemi (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA) ja PureLink[™] Genomic DNA Mini Kit'i (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA).

Koeproovid asetati FastPrep[™] Lysing Matrix A tuubidesse ning lisati 360 µl PureLink[™] Genomic Digestion Buffer'it. Segu homogeniseeriti kasutades FastPrep[®]-24 instrumenti seadistatuna kiirusele 6,5 m/s 40 sekundi vältel. Homogeniseeritud segudest eemaldati ~250 µl vedelikku, millele lisati 30 µl proteaas K lahust (PureLink[™] Genomic DNA Mini Kit) ning inkubeeriti temperatuuril 55°C 35 minutit. Edasised etapid teostati vastavalt PureLink[™] Genomic DNA Mini Kit tootja protokollile.

Eraldatud DNA puhtust kontrolliti NanoDrop[™] 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Kasutades geelelektroforeesi (1% agarosgeel, 100 V, 30 min), tehti kindlaks, et DNA ei olnud lagunenu.

Eraldatud DNA täpset hulka mõõdeti Qubit[®] 1.0 fluoromeetriga (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA). Kasutatud 40 mg kasvajakoele ning 97 mg rasvkoele eraldati vastavalt 5,7 µg ja 2,6 µg genoomset DNA-d.

2.2.4. Raamatukogu valmistamine ja sekveneerimine

Sekveneerimiseks valmistati raamatukogud vastavalt Ion AmpliSeq[™] Custom Panels (Life Technologies Corp., Carlsbad, California, USA) tootja juhiste. Raamatukogude valmistamiseks kasutatud paneel oli eelnevalt disainitud meie uurimisgrupi ja Tartu Ülikooli Kliinikumi onkoloogide koostöös. Antud paneel oli koostatud katmaks vähkkasvajate puhul

kliinilises praktikas huvipakkuvaid geenipiirkondi, ning koosnes 551 amplikonist kattes 45 erinevat geenipiirkonda kokku 68 260 aluspaari ulatuses.. Täpsed piirkonnad, mida kasutatud paneel katab, on välja toodud lisas 2, lk 42.

Amplifitseeritud ning puhastatud raamatukogude kvaliteedi hindamiseks kasutati Agilent 2100 Bioanalyzer'it koos High Sensitivity DNA Kit'ga (Agilent Technologies Inc., California, USA).

Valmistatud raamatukogud sekveneeriti Ion PGMTM platvormil kasutades kasutades Ion 316TM kiipi (Life Technologies Corp., Carlsbad, California, USA).

2.2.5. Andmeanalüüs

Sekveneeritud järjestustest variatsioonide tuvastamiseks kasutati Ion ReporterTM tarkvara (Life Technologies Corp., Carlsbad, California, USA). Tuvastatud variatsioonide edasiseks analüüsiks kasutati Ingenuity[®] Variant AnalysisTM (IVA) veebilahendust (Qiagen, Hilden, Germany), mille vahendusel filtreeriti välja variatsioonid, millede puhul aluspaarid oli määratud väiksema kvaliteediskooriga kui 20 ehk vähem kui 99% kindlusega ning variatsioonid, mis olid sekveneeritud vähem kui 10-kordse kattuvusega. Antud uurimustöö analüüsis kasutati IVA Cancer Driver Variances rakendust, mis keskendub just vähkkasvajate tekkega seotud variatsioonidele (SNV-d ja indelid). IVA veebilahendus koondab lisaks enda andmebaasile informatsiooni ka mitmetest eraldiseisvatest andmebaasidest ja rakendustest, näiteks ENCODE (*The Encyclopedia of DNA Elements*) andmebaas ja SIFT (*Sorting Tolerant From Intolerant*) algoritm, võimaldades hinnata variatsioonide geneetilist ja bioloogilist tähtsust.

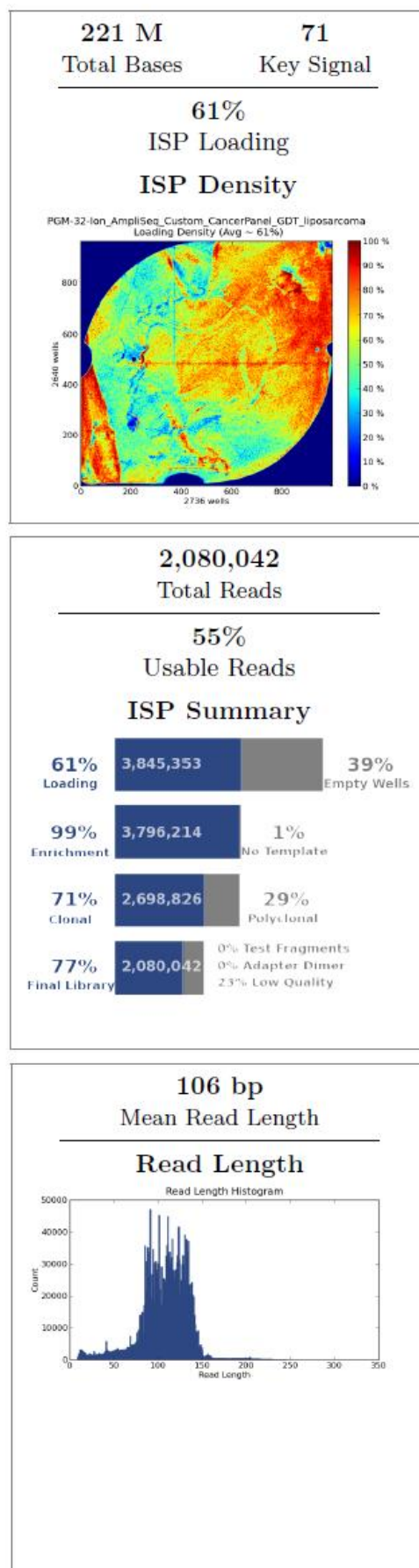
SIFT algoritm hindab aminohappe asendust valgu funktsiooni suhtes kas kahjustavaks või tolereeritavaks lähtudes asendatud aminohappe konserveerumusest antud valguperekonnas. (Kumar jt, 2009) Täiendatud SIFT algoritmi versioon B-SIFT (*Bi-directional Sorting Tolerant From Intolerant*) on võimeline eristama ka aktiveerivaid mutatsioone. (Lee jt, 2009) ENCODE projekt on aastaid kogunud informatsiooni funktsionaalsetest elementidest inimese genoomis. (ENCODE Project Consortium, 2012)

2.3. Tulemused

Kokku sekveneeriti ligikaudu 221 Mb, millest 214 Mb ulatuses joondusid sekveneeritud järjestused inimese referentsgenoomile. Liposarkoomi raamatukogu õnnestus sekveneerida keskmiselt 1364-kordse kattuvusega ning rasvkoe raamatukogu keskmiselt 2119-kordse kattuvusega. Väljavõtte sekveneerimisprotsessi raportist on toodud joonisel 4.

Sekveneeritud piirkondadest leiti kokku 39 SNP-d ja üks kolmenukleotiidiline deletsioon, mis ületasid kvaliteedimäära. Kolm SNP-d arvati nimistust välja, sest jäid piirkondadesse, millede sekveneerimine oli õnnestunud vaid ühest koest – kas tervest rasvkoest või kasvajakoe. Nende SNP-de puhul seega võrdlusmoment puudus. Nimistust välja arvatud 3 SNP-d asusid intronites ning nende kohta puudus annotatsioon dbSNP andmebaasis. Ülejäänud 37 variatsiooni osas kudede vahel erinevust ei esinenud, ning somaatilisi mutatsioone seega ei leitud.

IVA analüüsi tulemuste kohaselt võivad leitud variatsioonidest kaheksa olla vähkkasvajate kontekstis kahjustava mõjuga ning need on välja toodud tabelis 1, lk 21. Ülejäänud 29 variatsioonile võimalikku kahjustavat mõju ei ennustatud ning nende loetelu on toodud lisas 1, lk 40. Käesolevaks hetkeks teadaolevalt ühtegi leitud variatsiooni eelnevalt liposarkoomidega seostatud ei ole.



Joonis 4. Väljavõtte sekveneerimisprotsessi raportist.

Tabel 1. IVA analüüsi tulemusena potentsiaalselt kahjustavaks ennustatud SNP-d.

dbSNP ID	Kromo- soom	Geen	Geeni regioon	Hg19/ GRCh37	Lipo- sarkoom ¹	Terve rasvkude ¹	Mõju
rs1042919	11	<i>RRM1</i>	3'UTR	A	T/T	T/T	Võib suurendada <i>RRM1</i> ekspressiooni ³
rs7297175	12	<i>ERBB3</i>	Promootor	T	C/C	C/C	Promootori aktiivsuse kaotus ⁴
rs1799966	17	<i>BRCA1</i>	Ekson ²	T	C/T	C/T	<i>Missense</i> ; tolereetiav ⁵
rs16942	17	<i>BRCA1</i>	Ekson ²	T	C/T	C/T	<i>Missense</i> ; tolereeritav ⁵
rs16941	17	<i>BRCA1</i>	Ekson ²	T	C/T	C/T	<i>Missense</i> ; kahjustav ⁵
rs799917	17	<i>BRCA1</i>	Ekson ²	G	A/G	A/G	<i>Missense</i> ; Aktiveeriv ⁵
rs735482	17	<i>CD3EAP</i> ; <i>ERCC1</i>	Ekson; 3'UTR	A	C/A	C/A	<i>Missense</i> ; tolereeritav ⁵
rs3212986	17	<i>CD3EAP</i> ; <i>ERCC1</i>	Ekson; 3'UTR	C	A/C	A/C	<i>Missense</i> ; aktiveeriv ⁵

1. Mõlemad alleelid

2. Olenevalt transkriptist ka intron või ncRNA (*non-coding* RNA).

3. Cao, X. jt, 2013.

4. IVA hinnang tuginedes ENCODE TFBS (*The Encyclopedia of DNA Elements, Transcription Factor Binding Sites*) andmetele.

5. IVA poolt vahendatud SIFT (*Sorting Intolerant from Tolerant*) algoritmi tulemus.

2.4. Arutelu

Ühenukleotiidiliste variatsioonide mõju liposarkoomide tekkimise riskile, nende onkogeneesile või haiguse kulgemisele on uuritud minimaalselt. Liposarkoomide puhul on hästi kirjeldatud pigem suuremahulisi geneetilisi variatsioone. On teada liposarkoomidele omaseid kromosoomi piirkondade amplifikatsioone (Pedeutour jt, 1999), translokatsioone ning liitgeenide tekkimisi (Rabbitts jt, 1993).

Liposarkoomide puhul on kirjeldatud ühenukleotiidse polümorfismi SNP309 esinemist *MDM2* geeni promootoris. Kirjeldatud on ka ühenukleotiidsete indelite esinemist geenides *TP53*, *PIK3CA* ja *PTEN*. (Barretina jt, 2010) Käesolevas uurimistöös kasutatud paneel kattist

neist geenidest vaid *PTEN*-i ning *PIK3CA* 9. ja 20. eksonit. Kaetud *PIK3CA* regioonidest ühegi variatsiooni ei tuvastatud. *PTEN* geenist leiti nii terves rasvkoes kui ka kasvajakoes ühe SNP variantne alleel (lisa 1, lk 40), millele IVA ei omistanud võimalikku kahjustavat mõju. Kuigi ühtegi käesoleva uurimustöö tulemusena tuvastatud variatsiooni varasemalt liposarkoomiga seostatud ei ole, on neid kirjeldatud mitmete teiste vähkkasvajate taustal.

RRM1 (*ribonucleotide reductase M1*) geen kodeerib ribonukleotiidi reduktaasi (RNR) suuremat subühikut, mille struktuuri kuuluvad piirkonnad nii substraadi kui ka allosteeriliste regulaatorite sidumiseks. RNR katalüüsib ribonukleosiidi difosfaatide redutseerimist desoksüribonukleosiidi difosfaatideks ning on seega oluliseks komponendiks DNA sünteesiks vajalike nukleotiidide sünteesi metabolismirajas. (Jordheim jt, 2011) *RRM1* geeni ekspressioonitaseme määramine leiab rakendust farmakogeneetikas, kus kõrge rakusisesest dCTP kontsentratsioonist tuleneb resistentsus erinevate keemiaravis kasutatavate nukleosiidide analoogidel põhinevate ühendite suhtes, näiteks gemcitabine. (Cao jt, 2013)

On näidatud, et käesoleva uurimistöö tulemusena tuvastatud SNP rs1042919 pärandub sama haplotüübi koosseisus edasi mitmete teiste *RRM1* geeni piiresse jäävate SNP-dega. (Cao jt, 2013) Mainitud SNP-ga samas haplotüübis päranduvad SNP-d rs1348310, rs1042858 ja rs1042927 tuvastati ka käesoleva töö tulemusena (lisa 1, lk 40).

Cao, X. jt poolt teostatud uurimistöö tulemusena selgus, et *RRM1* geeni mRNA ekspressioonitase korreleerub oluliselt mainitud haplotüüpi kuuluvate SNP-dega rs1042927, rs12806698 ja rs11030918. (Cao jt, 2013) Variantset alleeli SNP rs12806698 puhul käesoleva uurimistöö tulemusena ei tuvastatud ning geeni *RRM1* promootori järjestusse jääv SNP rs11030918 jäi sekveneeritavatest piirkondadest välja. Kuid on näidatud, et tuvastatud SNP rs1042927 variantne alleel korreleerub *RRM1* geeni mRNA kõrgema ekspressioonitasemega. Samuti võib ka SNP rs1042919 variantne alleel olla otseselt seotud kõrgema *RRM1* ekspressioonitasemega, sest selle esinemine korreleerub nukleosiidide analoogide akumulatsiooniga rakus, mis on omakorda seotud normaalse desoksüribonukleotiidide sünteesiga normaalsest suuremal hulgal. (Cao jt, 2013) Selle põhjal võib oletada, et *RRM1* ekspressioonitase võis olla normaalsest kõrgem ka sekveneeritud terves rasvkoes ja liposarkoomi koos. Samas on varasemalt näidatud, et *RRM1* geeni üleekspressioon pigem pidurdab kasvaja arenemist. (Fan jt 1997)

ERBB3 (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*) kuulub epidermaalsete kasvufaktorite transmembraansete retseptorite perekonda. ErbB perekonda kuuluvad retseptor türosiinkinaasid on olulisteks raku normaalse kasvu ja arengu jaoks

vajalike signaalide mediaatoriteks. (Hynes ja Lane, 2005) ErbB retseptorid funktsioneerivad heterodimeeridena, milledest kõige olulisemaks paariks peetakse ERBB2-ERBB3 dimeeri. (Tazhar jt, 1996)

Käesolevas töös tuvastati SNP rs7297175 variantne alleel, mis asub *ERBB3* geeni promootorjärjestuses ning, lähtudes IVA analüüsi tulemustest, kattuvad selle positsiooniga mitmete transkriptsioonifaktorite (CCNT2, ZNF263, EGR, TAF1, ZBTB7A, HMGN3, FOSL2, E2F6, FOXA1, ARID3A, CTCF, JUNB, POLR2A, FOS, GATA2, HDAC2, SIN3A, SMARCB1, JUN, SMARCC1, JUND, CHD2, FOXC1, FOSL1) seondumispiirkonnad. See tähendab, et variantse alleeli esinemine võib mõjutada *ERBB3* ekspressiooni.

IVA näitab, et SNP rs7297175 variantse alleeli esinemine põhjustab *ERBB3* promootori funktsiooni kaotust, kuid on alust selles kahelda. Antud juhul on tegemist homosügootselt esineva variantse alleeliga, mis tähendaks *ERBB3* geeni ekspressiooni puudumist (alternatiivsete promootorite esinemise kohta informatsiooni ei leitud). Normaalselt ekspresseerub *ERBB3* täiskasvanud inimesel paljudes kudedes, suuremal hulgal näiteks aju-, neeru-, kopsu- ja kõhunäärme kudedes. (Su jt, 2004) *ERBB3* geen ekspresseerub ka lootel aju, maksa ning neerude kudedes (Kraus jt, 1989). Ühtlasi on näidatud, et *ErbB3* geeni, mis on *ERBB3* homoloog hiirtel, ekspressiooni puudumine embrüonaalses arengujärgus on hiirtele letaalne. (Erickson jt, 1997) Seega ei tundu usutav IVA poolt antud hinnang promootori funktsiooni täieliku kadumise kohta, pigem võib geeni ekspressiooni tase olla langenud. Siiani pole näidatud variatsiooni rs7297175 tegelikku seost *ERBB3* geeni ekspressiooniga ja hetkel jääb selgusetuks, kuidas variantne alleel geeni *ERBB3* ekspressiooni taset mõjutab.

ERBB3 üleekspressiooni on aga tuvastatud mitmetes erinevates vähkkasvajate tüüpides, muuhulgas rinnavähi (Naidu jt, 1998) ja munasarja kartsinoomi (Rajkumar jt, 1996) puhul. Ühtlasi on *ERBB3* võimeline otse seonduma PI3K kinaasi p85 subühikuga, mistõttu *ERBB2*-*ERBB3* dimeer on võimeline aktiveerima PI3K kinaasi ning seeläbi ka PI3K/Akt rada. (Soltoff jt, 1994) PI3K/Akt raja liigne aktiveeritus toob läbi mitmete mehhanismide kaasa apoptoosi inhibeerimise ning rakkude proliferatsiooni aktiveerimise. (Vara jt, 2004)

PI3K/Akt raja aktiivsust mõjutab ka fosfataas PTEN, mille ekspressiooni puudumine toob kaasa PI3K/Akt raja üleaktiveerumise. (Vara jt, 2004) Käesoleva töö raames tuvastati SNP rs11202607 (lisa 1, lk 40) variantne alleel tuumor-supressor geeni *PTEN* 3'UTR alast. Siiani ei ole veel teada, kas või kuidas variatsiooni rs11202607 variantne alleel mõjutab *PTEN* geeni ekspressiooni. Käesolevaks hetkeks on SNP rs11202607 kohta teada nii palju, et see ei ole seotud eesnäärmevähi tekkimise tõenäosusega. (Xie jt, 2011)

PI3K/Akt raja aktiveeritust on täheldatud müksoïdsete/ümarakuliste liposarkoomides. (Demicco jt, 2011) On võimalik, et PI3K/Akt rada omab olulist osatähtsust ka teiste liposarkoomi alamtüüpide onkogeneesis. (Gutierrez jt, 2011; Smith jt, 2013) Kuigi PI3K/Akt raja üleaktiveeritus näib oluliselt mõjutavat vähemalt RCLPS/MLPS liposarkoomi arengut, ei ole võimalik käesoleva uurimustöö raames tuvastatud SNP-de põhjal oletada PI3K/Akt raja aktiivsust uuritud kasvajakoes.

Käesoleva töö raames uuritud kudedest tuvastati ka 10 heterosügootset SNP-d *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) tuumor-supressor geenis, milledest nelja korral toob variantse alleeli esinemine kaasa *missense* mutatsiooni. *BRCA1* tuumor-supressor valk omab rolli DNA-s kaheahelaliste katkete parandamises, rekombinatsiooni protsessis ja BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) kompleksi moodustamises. *BRCA1* võib ühtlasi mõjutada ka transkriptsiooni interakteerudes RNA polümeraas II-ga. (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)

Kõige enam on *BRCA1* mutatsioone uuritud seoses rinnavähiga, kuid lisaks sellele on leitud, et *BRCA1* mutatsioonid on seotud ka kõrgema riskiga munasarja-, (Chen ja Paramigiani, 2007) eesnäärme- (Thompson ja Easton, 2002) ja kõhunäärmevähi (Ferrone jt, 2009) tekkeks. Tuvastatud 4 SNP-d (rs1799966, rs16942, rs16941 ja rs799917), millede variantsed alleelid põhjustavad *missense* mutatsioonid, on küllaltki levinud (Dombernowsky jt, 2009; Xu jt, 2012), kuid nende mõju kohta leidub vastukäivat informatsiooni.

SNP rs1799966 variantset alleeli on seostatud kõrgema riskiga rinnavähi tekkeks (Tommasi jt, 2005), kuid *BRCA1* valgu funktsioone see teadaolevalt ei mõjuta (Carvalho jt, 2007). Samas ei suudetud Dombernowsky, S. L. jt poolt läbiviidud uuringus näidata SNP rs1799966, ja ka SNP-de rs16941 ning rs799917, seost rinna- või munasarjavähi tekkimise riskiga. (Dombernowsky jt, 2009) Lisaks sellele on kahe eraldiseisva uuringu tulemusena leitud, et SNP rs16942 variantne alleel vähendab rinnavähi tekkimise riski. (Tommasi jt, 2005; Cox jt, 2011) Samuti on leitud, et nende nelja SNP variantsed alleelid võivad pigem vähendada tüümuse diferentseerunud kartsinoomi tekkimise riski (Xu jt, 2012*). Samade SNP-de variantsete alleelide kasvajate tekkeriski pigem vähendavat mõju järeldati ka uurimusest, mis põhines sõljenäärme kartsinoomidel. (Xu jt, 2012) Ühtegi nimetatud neljast *BRCA1 missense* polümorfismist pole varasemalt liposarkoomiga seoses uuritud. Ka käesoleva töö tulemusena jääb selgusetuks, kas või kuidas *BRCA1* geen ja leitud variatsioonid võivad liposarkoomi tekkimise ja patogeneesiga seotud olla.

Käesolevas töös tuvastatud geenide *CD3EAP* kodeeriva ala ja *ERCC1* 3'UTR ala piiresse jäävatele SNP-de rs735482 ja rs3212986 variantsete alleelide tegeliku mõju osas esineb samuti vastukäivat informatsiooni. 2011. aastal läbiviidud publikatsioonide meta-analüüsi tulemusena jõeldati, et SNP rs3212986 variantse ahela esinemine ei ole riskifaktoriks vähi tekkimisel. (Zhang jt, 2012) Samas on hilisem publikatsioonide meta-analüüs näidanud, et antud polümorfismi variantne alleel võib suurendada glioomi arenemise riski. (Fahmideh jt, 2014) 2013. aastal hiina populatsioonis läbiviidud uuring näitas, et SNP rs3212986 variantne alleel esines oluliselt sagedamini rinnavähki põdevate indiviidide kui kontrollgrupi seas. (Pei jt, 2014) Polümorfismi rs735482 variantse alleeli esinemist on aga seostatud pigem riski vähenemisega haigestuda põievähki. (Ricceri jt, 2010)

ERCC1 (*excision repair cross-complementation group 1*) geen omab funktsiooni NER (*nucleotide excision repair*) DNA reparaatsiooni rajas. (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) *ERCC1* ekspressioonitaseme määramine kasvaja puhul omab eelkõige farmakogeneetilist tähtsust, sest vaid madala *ERCC1* ekspressioonitasemega kasvaja on tundlikud platinumil põhinevatele keemiaravis kasutatavatele ühenditele, näiteks cisplatin. (Shirota jt, 2001; Olausson jt, 2006) Mitteväikerakulise kopsuvähi puhul on näidatud, et SNP rs3212986 variantse alleeli esinemine ei too kaasa muutusi *ERCC1* geeni ekspressioonis (Takenaka jt, 2010). Hetkel jääb selgusetuks kas või kuidas polümorfismid rs735482 ja rs3212986 käesolevas töös uuritud kudedes *ERCC1* ekspressiooni mõjutasid.

CD3EAP (*CD3e molecule, epsilon associated protein*) geeni produkti bioloogilisi funktsioone on kirjeldatud minimaalselt, kuid on näidatud selle lokaliseerumist rakutuumas ning *in vitro* interaktsioone RNA polümeraas I transkriptsiooni initsiatsiooni faktoriga UBF (*upstream binding factor*). (Whitehead jt, 1997) RNA polümeraas I funktsiooniks on rDNA transkriptsioon ning on näidatud, et suurenenud rDNA ekspressioon toob kaasa kiirenenud rakkude proliferatsiooni. (Zhao jt, 2003) Kas või kuidas käesolevas töös leitud *CD3EAP* missense mutatsioonid võivad mõjutada selle valguga funktsioone ja seeläbi ka interaktsioone UBF-ga ning rDNA ekspressiooni, jääb hetkel selgusetuks, kuid väärivad kindlasti edasist uurimist.

Käesoleva töö raames jääb teadmata, kas või millisel määral nimetatud variatsioonid mõjutasid uuritud vähkkasvaja teket ja arengut. Käesolev uurimustöö esitleb pigem meie töögrupi poolt koostatud paneeli rakendamist onkoloogilistes uuringutes nii prognostiliste, põhjuslike kui ka ravimeetodite määramisel oluliste variatsioonide tuvastamisel. Seda

seetõttu, et tuvastati nii võimalikke patogeneesi mõjutavaid kui ka farmakogeneetilist tähtsust omavaid variatsioone.

Kuigi ainult ühe juhtumi põhjal on väga raske järeldusi teha, siis pigem näib, et antud paneel ei kata liposarkoomi markerite uurimiseks vajalikke genoomialasid – paneeliga saab uurida kõigest 68 260 aluspaari, mis on vaid ligikaudu 0,2% inimese genoomi kodeerivast alast. Seetõttu on järgnevalt plaanis antud juhtumi puhul rakendada kogu eksoomi sekveneerimist. Viimase abil on võimalik määrata nii ühe- kui mitmenukleotiidseid variatsioone, indeleid ning koopia arvu variatsioone, mis võiks viia lähemale liposarkoomi patogeneesi paremale mõistmisele.

KOKKUVÕTE

Käesoleva tööga uuriti ühe patsiendi liposarkoomi ja terve rasvkoe genoome, kasutades selleks meie töögrupi poolt disainitud vähipaneeli. Töö tulemusena tuvastati 37 päritud geneetilist markerit, kuid ei leitud mutatsioone, mille poolest kasvaja- ja terve kude erinenud oleksid. Leitud variatsioone ei ole eelnevalt liposarkoomide puhul kirjeldatud, ning seega on raske teha järeldusi, kas või kuidas need uuritud liposarkoomi tekkimist või patogeneesi mõjutada võisid. Sellegi poolest on olemasolevate andmete põhjal võimalik arutleda vähemalt osade tuvastatud variatsioonide võimaliku mõju üle uuritud vähkkasvajale.

Antud töö tulemusena tuvastati mitmete SNP-de variantsed alleelid *RRM1* geenis, millede puhul on näidatud seost kõrgema *RRM1* ekspressioonitasemega. *RRM1* geeni kõrgem ekspressioonitase toob aga kaasa kasvaja kõrgema resistentsuse nukleosidi analoogidel põhinevate ravimite suhtes. Ka geeni *ERBB3* promootorist leiti SNP rs7297175 variantne alleel, mis jääb mitmete transkriptsioonifaktorite seondumise piirkonda ning võib seega mõjutada *ERBB3* ekspressiooni. *ERBB3* retseptor türosiinkinaas on aga võimeline aktiveerima mitmeid raku proliferatsiooniga seotud signaaliradasid, nagu näiteks PI3K/Akt rada, mille üleaktivatsiooni on kirjeldatud ka RCLPS/MLPS puhul.

Käesolevas töös tuvastati SNP-d rs735482 ja rs3212986, mis jäävad nii *ERCC1* kui ka *CD3EAP* geenide piiresse ning millede variantsed alleelid toovad *CD3EAP* puhul kaasa *missense* mutatsiooni. Käesoleva töö raames jääb selgusetuks, kas või kuidas need SNP-d võisid mõjutada *ERCC1* geeni ekspressiooni või *CD3EAP* poolt kodeeritud valgu funktsioone uuritud kudedes. *ERCC1* ekspressioonitaseme määramine omab farmakogeneetilist tähtsust ning on võimalik, et muutused *CD3EAP* valgu funktsioonis mõjutavad raku proliferatsiooni. Lisaks eelnevalt mainitud variatsioonidele, tuvastati ka neli *missense* mutatsiooni *BRCA1* geenis, kuid nende mõju osas esineb vastukäivat informatsiooni.

Käesoleva töös uuritud ühe juhtumi põhjal näib, et kasutatud vähipaneeli liposarkoomi tekkimist või selle patogeneesi mõjutavate väikeste indelite ja SNV-de uurimiseks rakendada pigem ei saa. Sellegi poolest esitleb antud uurimustöö meie uurimisgrupi poolt koostatud vähipaneeli rakendamise võimalikkust nii teadustöös kui ka kliinilises praktikas.

Targeted sequencing of a liposarcoma genome

Freddy Lättekivi

SUMMARY

Liposarcomas are rare malignant tumours which arise from lipid tissue. Although different chromosomal abnormalities are well characterized among liposarcoma subtypes, SNVs and small indels are yet to be substantially associated with liposarcoma tumourigenesis. The aim of this study was to use a custom panel designed by our research group, based on Ion Ampliseq[™] Target Selection Technology, in attempt to discover SNVs and small indels, which could be causally linked to liposarcoma tumourigenesis or have an effect on its further progression. In order to achieve that, DNA of a liposarcoma patient from both tumour tissue and healthy lipid tissue was sequenced and analysed.

As a result, no difference was found between genetic variations from tumour tissue and healthy lipid tissue, and therefore no somatic and potentially causative mutations were found. However, a total of 37 germline genetic variants were discovered, a few of which could have a possible effect on tumourigenesis. Although none of these variants have been previously described in liposarcomas, their possible causative effects and prognostic values have been demonstrated in other types of cancer. Nevertheless, the effects these variants might have had on the investigated tumour can only be speculated upon.

Several SNPs were found in the *RRM1* gene. The minor alleles of these polymorphisms are shown to correlate with higher *RRM1* expression levels, which in turn increase resistance to nucleoside analog-based chemotherapy. The uncovered minor allele of the rs7297175 SNP, which lies in the binding sites of numerous transcription factors, might have an effect on *ERBB3* expression levels. *ERBB3* tyrosine kinase can directly activate the PI3K/Akt pathway, which is shown to be associated with myxoid to round cell progression in liposarcomas.

Two SNPs (rs735482 ja rs3212986) were found in the 3'UTR of *ERCC1* gene and coding regions of *CD3EAP*. It remains unclear if or how these SNPs might have affected the expression of *ERCC1* gene or the functions of the protein coded by *CD3EAP* in the investigated tissues, but it is shown that *ERCC1* expression levels hold a pharmacogenetic significance as high expression levels cause resistance to platinum-based chemotherapy. The

protein coded by *CD3EAP* gene can affect cell proliferation via interactions with RNA polymerase I.

In addition to aforementioned SNPs, 10 SNPs were found in *BRCA1* gene, four of which were missense mutations. There is conflicting information on the prognostic value of these SNPs in terms of developing breast cancer, ovarian cancer or other carcinomas. It remains unclear if or how these SNPs in *BRCA1* gene could affect liposarcomas. As much as it is possible to conclude at this moment, the rest of the discovered SNVs and one small deletion probably hold no significance regarding the development or progression of liposarcomas and other tumours.

As a result of this study it can be concluded that the custom cancer panel designed by our research group is rather not suitable for investigating SNVs or small indels, which could be causally linked to liposarcomas. Although, it should be stressed that this study was based on only one case. Nevertheless, this study illustrates the possible use of the cancer panel designed by our research group in both scientific research and medical practise.

KASUTATUD KIRJANDUS

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G. R., Auton, A., Brooks, L. D., DePristo, M. A., Durbin, R. M., Handsaker, R. E., Kang, H. M., Marth, G. T., McVean, G. A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 491: 56-65.
- Al Olama, A. A., Kote-Jarai, Z., Giles, G. G., Guy, M., Morrison, J., Severi, G., Leongamornlert, D. A., Tymrakiewicz, M., Jhavar, S., Saunders, E., Hopper, J. L., Southey, M. C., Muir, K. R., English, D. R., Dearnaley, D. P., Ardern-Jones, A. T., Hall, A. L., O'Brien, L. T., Wilkinson, R. A., Sawyer, E., Lophatananon, A.; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators/British Association of Urological Surgeons Section of Oncology; UK Prostate testing for cancer and Treatment study (ProtecT Study) Collaborators, Horwich, A., Huddart, R. A., Khoo, V. S., Parker, C. C., Woodhouse, C. J., Thompson, A., Christmas, T., Ogden, C., Cooper, C., Donovan, J. L., Hamdy, F. C., Neal, D. E., Eeles, R. A., Easton, D. F. (2009). Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 41: 1058-60.
- Antonescu, C. R., Tschernyavsky, S. J., Decuseara, R., Leung, D. H., Woodruff, J. M., Brennan, M. F., Bridge, J. A., Neff, J. R., Goldblum, J. R., Ladanyi, M. (2001). Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clinical Cancer Research*. 7: 3977-3987.
- Balmain, A., Gray, J., Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nat genet.* 33:238-44.
- Barretina, J., Taylor, B. S., Banerji, S., Ramos, A. H., Lagos-Quintana, M., Decarolis, P. L., Shah, K., Socci, N. D., Weir, B. A., Ho, A., Chiang, D. Y., Reva, B., Mermel, C. H., Getz, G., Antipin, Y., Beroukhi, R., Major, J. E., Hatton, C., Nicoletti, R., Hanna, M., Sharpe, T., Fennell, T. J., Cibulskis, K., Onofrio, R. C., Saito, T., Shukla, N., Lau, C., Nelander, S., Silver, S. J., Sougnez, C., Viale, A., Winckler, W., Maki, R. G., Garraway, L. A., Lash, A., Greulich, H., Root, D. E., Sellers, W. R., Schwartz, G. K., Antonescu, C. R., Lander, E. S., Varmus, H. E., Ladanyi, M., Sander, C., Meyerson, M., Singer, S. (2010). Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat genet.* 42: 715-721.
- Barros-Silva, J. D., Leitão, D., Afonso, L., Vieira, J., Dinis-Ribeiro, M., Fragoso, M., Bento, M. J., Santos, L., Ferreira, P., Rêgo, S., Brandão, C., Carneiro, F., Lopes, C., Schmitt, F., Teixeira, M. R. (2009). Association of ERBB2 gene status with histopathological

- parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br. J. Cancer.* 100: 487-493.
- Bertolotti, A., Lutz, Y., Heard, D. J., Chambon, P., Tora, L. (1996). hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J.* 15: 5022-5031.
- Batchvarova, N., Wang, X.-Z., Ron, D. (1995). Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd153). *EMBO J.* 14: 4654-4661.
- Binh, M. B. N, Sastre-Garau, X., Guillou, L., de Pinieux, G., Terrier, P., Lagace', R., Aurias, A., Hostein, I., Coindre, J. M. (2005). MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. *Am. J. Surg. Pathol.* 10: 1340-1347.
- Bond, G. L., Hu, W., Bond, E. E., Robins, H., Lutzker, S. G., Arva, N. C., Bargonetti, J., Bartel, F., Taubert, H., Wuerl, P., Onel, K., Yip, L., Hwang, S., Strong, L. C., Lozano, G., Levine, A. J. (2004). A Single Nucleotide Polymorphism in the *MDM2* Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell.* 199: 591-602.
- Cao, X., Mitra, A. K., Pounds, S., Crews, K. R., Ghandi, V., Plunkett, W., Dolan, M. E., Hartford, C., Raimondi, S., Campana, D., Downing, J., Rubnitz, J. E., Riebeiro, R. C., Lamba, J. K. (2013). RRM1 and RRM2 pharmacogenetics: association with phenotypes in HapMap cell lines and acute myeloid leukemia patients. *Pharmacogenomics.* 14: 1449-1466.
- Carvalho, M. A., Marsillac, S. M., Karchin, R., Manoukian, S., Grist, S., Swaby, R. F., Urmenyi, T. P., Rondinelli, E., Silva, R., Gayol, L., Baumbach, L., Sutphen, R., Pickard-Brzosowicz, J. L., Nathanson, K. L., Sali, A., Goldgar, D., Couch, F. J., Radice, P., Monteiro, A. N. (2007). Determination of cancer risk associated with germ line BRCA1 missense variants by functional analysis. *Cancer Res.* 67: 1494-501.
- Chanock, S. (2001). Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis. Markers.* 17: 89-98.
- Chari, R., Thu, K. L., Wilson, I. M., Lockwood, W. W., Lonergan, K. M., Coe, B. P., Malloff C. A., Gazdar, A. F., Lam, S., Garnis, C., MacAulay, C. E., Alvarez, C. E., Lam, W. L. (2010). Integrating the multiple dimensions of genomic and epigenomic landscapes of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 29: 73-93.

- Chen, S. ja Paramigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J. Clin. Oncol.* 25: 1329-1333.
- Conyers R., Young S., Thomas DM. (2011): Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics. *Sarcoma*. Epub 2011:483154.
- Cox, D. G., Simard, J., Sinnett, D. jt. (2011). Common variants of the BRCA1 wild-type allele modify the risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers. *Hum. Mol. Genet.* 20: 4732-4747.
- Dal Cin, P., Sciot, R., Panagopoulos, I., Aman, P., Samson, I., Mandahl, N., Mitelman, F., Van den Berghe, H., Fletcher, C. D. (1997): Additional evidence of a variant translocation t(12;22) with EWSCHOP fusion in myxoid liposarcoma Clinicopathologic features. *J. Pathol.* 182: 437-441.
- Dei Tos, A. P. (2000): Liposarcoma: New Entities and Evolving Concepts. *Ann. Diagn. Pathol.* 4: 252-266.
- Dei Tos, A. P., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Mentzel, T., Barbareschi, M., Boiocchi, M., Fletcher, C. D. (1997). Molecular abnormalities of the p53 pathway in dedifferentiated liposarcoma. *J. Pathol.* 181: 8-13.
- Demicco, E. G., Torres, K. E., Ghadimi, M., Colombo, C., Bolshakov, S., Hoffman, A., Peng, T., Bovè, J. V. M. G., Lev, W. W. D., Lazar, A. J. (2011). Involvement of the PIK3CA/Akt pathway in myxoid/runc cell liposarcoma. *Mod. Pathol.* 25: 212-221.
- Dombernowsky, S. L., Weischer, M., Freiberg, J. J., Bojesen, S. E., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B. G. (2009). Missense polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk on breast and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 18: 2339-42.
- ENCODE Project Consortium, Bernstein, B. E., Birney, E., Dunham, I., Green, E. D., Gunter, C., Snyder, M. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in human genome. *Nature.* 489: 57-74.
- Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H., Moore, M. W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development.* 124: 4999-5011.
- Fahmideh, M. A., Schwartzbaum, J., Frumento, P., Feychting, M. (2014). Association between DNA repair gene polymorphisms and risk of glioma: A systematic review and meta-analysis. *Neuro. Oncol.* 16: 807-814.

- Fan, H., Huang, A., Villegas, C., Wright, J. A. (1997). The R1 component of mammalian ribonucleotide reductase has malignancy-suppressing activity as demonstrated by gene transfer experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 13181-13186.
- Fedele, M., Berlingieri, M. T., Scala, S., Chiariotti, L., Viglietto, G., Rippel, V., Bullerdiek, J., Santoro, M., Fusco, A. (1998). Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene*. 17: 413-418.
- Ferrone, C. R., Levine, D. A., Tang, L. H., Allen, P. J., Jarnagin, W., Brennan, M. F., Offit, K., Robson, M. E. (2009). BRCA germline mutations in Jewish patients with pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 27: 433-438.
- Fletcher C. D. M., Unni K. K., Mertens F. (2002). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, p 35-43. IARC Press, Lyon.
- Frazer, K. A., Murray, S. S., Schork, N. J., Topol, E. J. (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 10: 241-51.
- Ghadimi, M. P., Liu, P., Peng, T., Bolshakov, S., Young, E. D., Torres, K. E., Colombo, C., Hoffman, A., Broccoli, D., Hornick, J. L., Lazar, A. J., Pisters, P., Pollock, R. E., Lev, D. (2011). Pleomorphic liposarcoma: clinical observations and molecular variables. *Cancer* 117: 5359-5369.
- Giampaoli, S., Chillemi, G., Valeriani, F., Lazzaro, D., Borro, M., Gentile, G., Simmaco, M., Zanni, G., Berti, A., Roman, S. V. (2013). The SNPs in the human genetic blueprint era. *N. Biotechnol.* 30: 475-84
- Gutierrez, A., Snyder, E. L., Marino-Enriquez, A., Zhang, Y. X., Sioletic, S., Kozakewich, E., Grebliunaite, R., Ou, W. B., Sicinska, E., Raut, C. P., Demetri, G. D., Perez-Atayde, A. R., Wagner, A. J., Fletcher, J. A., Fletcher, C. D., Look, A. T. (2011). Abberant AKT activation drives well-differentiated liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 16386-16391.
- Gustafson, P., Rydholm, A., Willén, H., Baldetop, B., Fernö, M., Akerman, M. (1993). Liposarcoma: a population-based epidemiologic and prognostic study of features of 43 patients, including tumor DNA content. *Int. J. Cancer.* 55: 541-546.
- Haraksingh, R. R. ja Snyder, M. P. (2013). Impacts of variation in the human genome on gene regulation. *J. Mol. Biol.* 425: 3970-3977.
- Hindorff, L. A., Sethupathy, P., Junkins, H. A., Ramos, E. M., Mehta, J. P., Collins, F. S., Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide

- association loci for human diseases and traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 9362-9367.
- Hynes, N. E. ja Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 5: 341-354.
- Idbaih, A., Coindre, J. M., Derrè, J., Mariani, O., Terrier, P., Ranchère, D., Mairal. A., Aurias, A. (2005). *Lab Invest.* 85: 176-181.
- International Cancer Genome Consortium, jt. (2010). International network of cancer genome projects. *Nature.* 464: 993-998.
- Ito, M., Barys, L., O'Reilly, T., Young, S., Gorbacheva, B., Monahan, J., Zumstein-Mecker, S., Choong, P. F., Dickinson, I., Crowe, P., Hemmings, C., Desai, J., Thomas, D. M., Lisztwan, J. (2011). Comprehensive mapping of p53 pathway alterations reveals an apparent role for both SNP309 and MDM2 amplification in sarcomagenesis. *Clin. Cancer Res.* 17: 416-426.
- Jones, N. R., Spratt, T. E., Berg, A. S., Muscat, J. E., Lazarus, P., Gallagher, C. J. (2011). Association studies of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 (ERCC1) haplotypes with lung and head and neck cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Epidemiol.* 35: 175-181.
- Jordheim, L. P., Sève, P., Trèdan, O., Dumontet, C. (2011). The Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer. *Lancet. Oncol.* 12: 693-702.
- Kamalakaran, S., Varadan, V., Janevski, A., Banerjee, N., Tuck, D., McCombie, W. R., Dimitrova, N., Harris, L. N. (2013). Translating next generation sequencing to practice: opportunities and necessary steps. *Mol. Oncol.* 7:743-755.
- Kindblom, L. G. (2006). Lipomatous tumors-how we have reached our present views, what controversies remain and why we still face diagnostic problems: a tribute to Dr Franz Enzinger. *Adv. Anat. Pathol.* 13: 279-285.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C., Aaronson, S. A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member on the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 9193-9197.
- Ku, C. S, Loy, E. Y., Pawitan, Y., Chia, K. S. (2010). The pursuit of genome-wide association studies: where are we now? *J. Human. Genet.* 55: 195-206.
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymus variants on protein function using SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4: 1073-1081.

- Lee, W., Zhang, Y., Mukhyala, K., Lazarus, R. A., Zhang, Z. (2009). Bi-Directional SIFT Predicts a Subset of Activating Mutations. *PLoS One*. 4: e8311.
- Ley, T. J., Mardis, E. R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M. D., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B. H., McGrath, S., Hickenbotham, M., Cook, L., Abbott, R., Larson, D. E., Koboldt, D. C., Pohl, C., Smith, S., Hawkins, A., Abbott, S., Locke, D., Hillier, L. W., Miner, T., Fulton, L., Magrini, V., Wylie, T., Glasscock, J., Conyers, J., Sander, N., Shi, X., Osborne, J. R., Minx, P., Gordon, D., Chinwalla, A., Zhao, Y., Ries, R. E., Payton, J. E., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Watson, M., Baty, J., Ivanovich, J., Heath, S., Shannon, W. D., Nagarajan, R., Walter, M. J., Link, D. C., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Wilson, R. K. (2008). DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 456: 66-72.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:251364.
- Matullo, G., Di Gaetano, C., Guarrera, S. (2013). Next Generation Sequencing and Rare Genetic Variants: From Human Population Studies to Medical Genetics. *Environ. Mol. Mutagen.* 54: 518-532.
- McCormick, D., Mentzel, T., Beham, A., Fletcher, C. D. (1994): Dedifferentiated liposarcoma. Clinicopathologic analysis of 32 cases suggesting a better prognostic subgroup among pleomorphic sarcomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 18: 1213-1223
- Mertens, F., Fletcher, C. D., Dal Cin, P., De Wever, I., Mandahl, N., Mitelman, F., Rosai, J., Rydholm, A., Sciort, R., Tallini, G., Van den Berghe, H., Vanni, R., Willén, H. (1998). Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphogenic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. *Chromosomes and Morphology. Genes Chromosomes Cancer.* 22: 16-25.
- Nachman, M. W. ja Crowell, S. L. (2000) Estimate of the Mutation Rate per Nucleotide in Humans. *Genetics.* 156: 297-304.
- Naidu, R., Yadav, M., Nair, S., Kutty, M. K. (1998). Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br. J. Cancer.* 78: 1385-1390.
- Olaussen, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., André, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J. P., Tursz, T., Le Chevalier, T., Soria, J. C. (2006) DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355: 983-91.

- Pavlopoulos, G. A., Oulas, A., Iacucci, E., Sifrim, A., Moreau, Y., Schneider, R., Aerts, J., Iliopoulos, I. (2013). Unraveling genomic variation from next generation sequencing data. *BioData Min.* 6:13.
- Pedeutour, F., Forus, A., Coindre, J.-M., Berner, J.-M., Nicolo, G., Michiels, J.-F., Terrier, P., Ranchere-Vince, D., Collin, F., Myklebost, O., Turc-Carel, C. (1999): Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 24: 30-41.
- Pei, X. H., Yang, Z., Lv, X. Q., Li, H. X. (2014). Genetic variation in ERCC1 and XPF genes and breast cancer risk. *Genet. Mol. Res.* 13: 2259-2267.
- Pilotti, S., Della Torre, G., Lavarino, C., Di Palma, S., Sozzi, G., Minoletti, F., Rao, S., Pasguini, G., Azzarelli, A., Rike, F., Pierotti, M. A. (1997). Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms. *J. Pathol.* 181: 14-23.
- Post, S. M., Quintás-Cardama, A., Pant, V., Iwakuma, T., Hamir, A., Jackson, J. G., Maccio, D. R., Bond, G. L., Johnson, D. G., Levine, A. J., Lozano, G. (2010). A high-frequency regulatory polymorphism in the p53 pathway accelerates tumor development. *Cancer Cell.* 18: 220-230.
- Rabbitts, T. H., Forster, A., Larson, R., Nathan, P. (1993). Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat. genet.* 4:175-180.
- Rajkumar, T., Stamp, G. W. H., Hughes, C. M., Gullick, W. J. (1996). c-cerbB3 protein expression in ovarian cancer. *Clin. Mol. pathol.* 49: 199-202.
- Ricceri, F., Guarrera, S., Sacerdote, C., Polidoro, S., Allione, A., Fontana, D., Destefanis, P., Tizzani, A., Casetta, G., Cucchiareale, G., Vineis, P., Matullo, G. (2010). ERCC1 haplotypes modify bladder cancer risk: a case-control study. *DNA Repair (Amst).* 9: 191-200.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J. A., Namsaraev, E., McKernan, K. J., Williams, A., Roth, G. T., Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* 475: 348-52.

- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M. , Stein, L. D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J. C., Mortimore, B. J., Willey, D. L., Hunt, S. E., Cole, C. G., Coggill, P. C., Rice, C. M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D. R., Kwok, P. Y., Mardis, E. R., Yeh, R. T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R. H., McPherson, J. D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W. J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M. J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M. C., Linton, L., Lander, E. S., Altshuler, D.; International SNP Map Working Group (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 409: 928-33.
- Sandberg, A. A. (2004). Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 155: 1-24.
- Savage, S. A., Chanock, S. J. (2006). Genetic association studies in cancer: Good, bad or no longer ugly? *Hum. Genomics*. 2: 415-421.
- Savas, S., Liu, G. (2009). Genetic variations as cancer prognostic markers: review and update. *Hum. Mutat*. 30: 1369-1377.
- *Savas, S., Liu, G. (2009). Studying genetic variations in cancer prognosis (and risk) A primer for clinicians. *Oncologist*. 14: 657-666.
- Sherry, S. T., Ward, M.-H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 29: 308-311
- Shirota, Y., Stoecklacher, J., Brabender, J., Xiong, Y. P., Uetake, H., Danenberg, K. D., Groshen, S., Tsao-Wei, D. D., Danenberg, P. V., Lenz, H. J. (2001). ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol*. 19: 4298-4304.
- Smith, K. B., Tran, L. M., Tam, B. M., Shurell, E. M., Li, Y., Braas, D., Tap, W. D., Christofk, H. R., Dry, S. M., Eilber, F. C., Wu, H. (2013). Novel dedifferentiated liposarcoma xenograft models reveal PTEN down-regulation as a malignant signature and response to PI3K pathway inhibition. *Am. J. Pathol*. 182: 1400-11.
- Soltoff, S. P., Carraway, K. L. 3rd, Prigent, S. A., Gullick, W. G., Cantley, L. C. (1994). ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol*. 14: 3550-3558.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yunk, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgrad, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.

- H., Tavtigian, S. V. (1997). Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advance cancers. *Nat. Genet.* 15: 356-362
- Stiller, C. A., Trama, A., Serraino, D., Rossi, S., Navarro, C., Chirlaque M. D., Casali P. G., The RARECARE Working Group (2013): Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: Report from the RARECARE project. *European Journal of Cancer* 49: 684–695.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature.* 458: 719-724.
- Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M. P., Walker, J. R., Hogenesch, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 6062-6067.
- Zhang, L., Wang, J., Xu, L., Zhou, J., Guan, X., Jiang, F., Wu, Y., Fan, W. (2012) Nucleotide excision repair gene ERCC1 polymorphisms contribute to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mutagenesis.* 27: 67-76.
- Zhao, J., Yuan, X., Frödin, M., Grummt, I. (2003). ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol. Cell.* 11: 405-413
- Taioli, E. (2008). Gene–environment interaction in tobacco-related cancers. *Carcinogenesis.* 29: 1467-1474.
- Takenaka, T., Yano, T., Kiyohara, C., Miura, N., Kouso, H., Ohba, T., Kometani, T., Shoji, F., Yoshino, I., Maehara, Y. (2010). Effects of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) single nucleotide polymorphisms on the prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 67: 101-107.
- Talbot, S. J. ja Crawford, D. H. (2004). Viruses and tumours – an update. *Eur. J. Cancer.* 40: 1998-2005.
- Taylor, B. S., Barretina, J., Socci, N. D., DeCarolis, P., Ladanyi, M., Meyerson, M., Singer, S., Sander, C. (2008). *PloS ONE.* 3: e3179.
- Thompson, D. ja Easton, D. F. (2002). Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 1358-1365.
- Tishkoff, S. A. ja Kidd, K. K. (2004). Implications of biogeography of human populations for 'race' and medicine. *Nat. Genet.* 36: 21-27.

- Tommasi, S., Crapolicchio, A., Lacalamita, R., Bruno, M., Monaco, A., Petroni, S., Schittulli, F., Longo, S., Digennaro, M., Calistri, D., Mangia, A., Paradiso, A. (2005). BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy. *Mutat Res.* 578: 395-405.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., Yarden, Y. (1996). A Hierarchy network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5276-5287.
- Vara, J. À. F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M. (2004). *Cancer Treat. Rev.* 30: 193-204.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34: 275-305.
- Whitehead, C. M., Winkfein, R. J., Fritzler, M. J., Rattner, J. B. (1997). ASE-1: a novel protein of the fibrillar centres of the nucleolus and nucleolus organizer region of mitotic chromosomes. *Chromosoma.* 106: 493-502.
- Xie, C. C., Lu, L., Sun, J., Zheng, S. L., Isaacs, W. B., Gronberg, H., Xu, J. (2011) Germ-line sequence variants of PTEN do not have an important role in hereditary and non-hereditary prostate cancer susceptibility. *J. Hum. Genet.* 56: 496-502.
- Xu, L., Doan, P. C., Wei, Q., Li, G., Sturgis, E. M. (2012). Functional single-nucleotide polymorphisms in the BRCA1 gene and risk on salivary gland carcinoma. *Oral Oncol.* 48: 842-847.
- *Xu, L., Doan, P. C., Wei, Q., Liu, W., Li, G., Sturgis, E. M. (2012). Association of BRCA1 Functional Single Nucleotide Polymorphisms with Risk of Differentiated Thyroid Carcinoma. *Thyroid.* 22: 35-43.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.allseq.com/>

<http://www.cancer.gov>

<https://www.ingenuity.com/products/variant-analysis>

<http://www.lifetechnologies.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

LISAD

Lisa 1. SNP-d, millele IVA poolt võimalikku kahjustavat mõju ei ennustatud.

dbSNP ID	Kromo- soom	Geen	Geeni regioon	Hg19/ GRCh37	Lipo- sarkoom ¹	Terve rasvkude ¹	Kommentaariid
rs2276550	2	<i>ALK</i>	Intron	C	C/G	C/G	-
rs4622670	2	<i>ALK</i>	Intron	G	G/A	G/A	-
rs3830355	4	<i>PDGFRA</i>	Intron	T	T/TA	T/TA	-
rs2228230	4	<i>PDGFRA</i>	Ekson	C	C/T	C/T	Sünonüümne asendus
rs1008658	4	<i>KIT</i>	Intron	T	C/C	C/C	-
rs11202607	10	<i>PTEN</i>	3'UTR	C	C/T	C/T	-
rs12806698	11	<i>RRM1</i>	5'UTR	C	C/A	C/A	-
rs1348310	11	<i>RRM1</i>	Intron	C	G/G	G/G	-
rs183484	11	<i>RRM1</i>	Ekson	C	C/A	C/A	Sünonüümne asendus
rs9937	11	<i>RRM1</i>	Ekson	A	A/G	A/G	Sünonüümne asendus
rs1042858	11	<i>RRM1</i>	Ekson	G	A/A	A/A	Sünonüümne asendus
rs1042927	11	<i>RRM1</i>	3'UTR	C	A/A	A/A	-
rs2271194	12	<i>ERBB3</i>	Intron	A	T/T	T/T	-
rs12516	17	<i>BRCA1</i>	3'UTR; ncRNA	G	G/A	G/A	-
rs8176318	17	<i>BRCA1</i>	3'UTR; ncRNA	C	C/A	C/A	-

rs3092994	17	<i>BRCA1</i>	Intron	C	C/T	C/T	-
rs1060915	17	<i>BRCA1</i>	Ekson; ncRNA	A	A/G	A/G	Sünonüümne asendus
rs16940	17	<i>BRCA1</i>	Ekson; ncRNA; intron	A	A/G	A/G	Sünonüümne asendus
rs1799949	17	<i>BRCA1</i>	Ekson; ncRNA; intron	G	G/A	G/A	Sünonüümne asendus
rs3212961	19	<i>ERCC1</i>	Intron	G	T/T	T/T	-
rs11615	19	<i>ERCC1</i>	Ekson	A	G/G	G/G	Sünonüümne asendus
rs3212948	19	<i>ERCC1</i>	Intron	A	C/C	C/C	-
rs2072791	20	<i>SDC4</i>	Intron	G	C/C	C/C	-
rs1337076	X	<i>AR</i>	Intron	T	G/G	G/G	-
rs5919413	X	<i>AR</i>	3'UTR	T	C/C	C/C	-
rs1931537	X	<i>AR</i>	3'UTR	T	C/C	C/C	-
rs7440	X	<i>AR</i>	3'UTR	C	T/T	T/T	-
rs140258587	X	<i>AR</i>	3'UTR	TAAG	TAAG/T	TAAG/T	-
rs2362520	X	<i>AR</i>	3'UTR	C	T/T	T/T	-

Lisa 2. Meie uurimisgrupi poolt väljatöötatud paneeli poolt kaetud genoomi alad.

Geen	Kromo- soom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Geen	Kromo- soom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp
<i>NRAS</i> 3. ekson	1	115256402	115256523	<i>ERBB2</i>	17	37884059	37884192
<i>NRAS</i> 3. ekson	1	115256523	115256646	<i>ERBB2</i>	17	37884192	37884315
<i>NRAS</i> 2. ekson	1	115258593	115258692	<i>ERBB2</i>	17	37884310	37884443
<i>NRAS</i> 2. ekson	1	115258692	115258798	<i>ERBB2</i>	17	37884441	37884557
<i>TPM1</i> 8. ekson	1	154142847	154142967	<i>ERBB2</i>	17	37884556	37884660
<i>ALK</i> 20. ekson	2	29446151	29446278	<i>ERBB2</i>	17	37884660	37884745
<i>ALK</i> 20. ekson	2	29446278	29446404	<i>ERBB2</i>	17	37884745	37884864
<i>EML4</i> 2. ekson	2	42472673	42472750	<i>ERBB2</i>	17	37884845	37884963
<i>EML4</i> 2. ekson	2	42472729	42472809	<i>BRCA1</i>	17	41196288	41196368
<i>EML4</i> 6. ekson	2	42491868	42491942	<i>BRCA1</i>	17	41196361	41196473
<i>EML4</i> 13. ekson	2	42522488	42522587	<i>BRCA1</i>	17	41196468	41196577
<i>EML4</i> 13. ekson	2	42522587	42522690	<i>BRCA1</i>	17	41196576	41196699
<i>EML4</i> 14. ekson	2	42528418	42528514	<i>BRCA1</i>	17	41197132	41197215
<i>EML4</i> 14. ekson	2	42528481	42528565	<i>BRCA1</i>	17	41197215	41197294
<i>EML4</i> 15. ekson	2	42530157	42530262	<i>BRCA1</i>	17	41197294	41197398
<i>EML4</i> 15. ekson	2	42530262	42530371	<i>BRCA1</i>	17	41197398	41197521
<i>EML4</i> 17. ekson	2	42531595	42531719	<i>BRCA1</i>	17	41197509	41197629
<i>EML4</i> 18. ekson	2	42543115	42543223	<i>BRCA1</i>	17	41197624	41197752
<i>EML4</i> 20. ekson	2	42552559	42552667	<i>BRCA1</i>	17	41197742	41197829
<i>EML4</i> 20. ekson	2	42552659	42552778	<i>BRCA1</i>	17	41199640	41199737
<i>UGT1A1</i>	2	234668803	234668934	<i>BRCA1</i>	17	41201118	41201236
<i>PIK3CA</i> 9. ekson	3	178928183	178928290	<i>BRCA1</i>	17	41203054	41203159
<i>PIK3CA</i> 9. ekson	3	178928290	178928355	<i>BRCA1</i>	17	41209055	41209164
<i>PIK3CA</i> 20. ekson	3	178947985	178948058	<i>BRCA1</i>	17	41215293	41215418
<i>PIK3CA</i> 20. ekson	3	178948052	178948164	<i>BRCA1</i>	17	41215803	41215928
<i>SLC34A2</i> 12. ekson	4	25676044	25676153	<i>BRCA1</i>	17	41215928	41216008
<i>SLC34A2</i> 12. ekson	4	25676150	25676284	<i>BRCA1</i>	17	41219608	41219731
<i>PDGFRA</i> 18. ekson	4	55151943	55152058	<i>BRCA1</i>	17	41222916	41222984
<i>PDGFRA</i> 18. ekson	4	55152058	55152175	<i>BRCA1</i>	17	41222984	41223114
<i>CKIT</i> 9. ekson	4	55592006	55592108	<i>BRCA1</i>	17	41223114	41223212
<i>CKIT</i> 9. ekson	4	55592108	55592230	<i>BRCA1</i>	17	41223212	41223295
<i>CKIT</i> 11. ekson	4	55593473	55593597	<i>BRCA1</i>	17	41226337	41226428
<i>CKIT</i> 11. ekson	4	55593597	55593710	<i>BRCA1</i>	17	41226428	41226544
<i>CKIT</i> 13. ekson	4	55594153	55594289	<i>BRCA1</i>	17	41228490	41228576
<i>CKIT</i> 17. ekson	4	55599232	55599339	<i>BRCA1</i>	17	41228576	41228658
<i>CKIT</i> 17. ekson	4	55599335	55599442	<i>BRCA1</i>	17	41231304	41231431
<i>CD74</i> 6. ekson	5	149784225	149784351	<i>BRCA1</i>	17	41234352	41234475
<i>ROS1</i> 35. ekson	6	117642384	117642490	<i>BRCA1</i>	17	41234475	41234593
<i>ROS1</i> 35. ekson	6	117642490	117642614	<i>BRCA1</i>	17	41242845	41242963
<i>ROS1</i> 34. ekson	6	117645417	117645505	<i>BRCA1</i>	17	41242963	41243060
<i>ROS1</i> 34. ekson	6	117645513	117645633	<i>BRCA1</i>	17	41243448	41243568
<i>ROS1</i> 32. ekson	6	117650493	117650597	<i>BRCA1</i>	17	41243568	41243692
<i>ROS1</i> 32. ekson	6	117650595	117650700	<i>BRCA1</i>	17	41243692	41243805
<i>EZR</i> 10. ekson	6	159191703	159191812	<i>BRCA1</i>	17	41243805	41243903

<i>EZR</i> 10. ekson	6	159191811	159191936
<i>EGFR</i> 18. ekson	7	55241596	55241679
<i>EGFR</i> 18. ekson	7	55241679	55241800
<i>EGFR</i> 19. ekson	7	55242411	55242539
<i>EGFR</i> 20. ekson	7	55248984	55249117
<i>EGFR</i> 20. ekson	7	55249117	55249200
<i>EGFR</i> 21. ekson	7	55259367	55259486
<i>EGFR</i> 21. ekson	7	55259484	55259567
<i>BRAF</i> 15. ekson	7	140452972	140453099
<i>BRAF</i> 15. ekson	7	140453099	140453224
<i>BRAF</i> 11. ekson	7	140481297	140481387
<i>BRAF</i> 11. ekson	7	140481387	140481511
<i>PTEN</i>	10	89623173	89623311
<i>PTEN</i>	10	89623257	89623396
<i>PTEN</i>	10	89623391	89623499
<i>PTEN</i>	10	89623469	89623588
<i>PTEN</i>	10	89623620	89623759
<i>PTEN</i>	10	89623969	89624105
<i>PTEN</i>	10	89624097	89624222
<i>PTEN</i>	10	89624216	89624338
<i>PTEN</i>	10	89653745	89653817
<i>PTEN</i>	10	89653816	89653930
<i>PTEN</i>	10	89685258	89685374
<i>PTEN</i>	10	89690819	89690917
<i>PTEN</i>	10	89692713	89692819
<i>PTEN</i>	10	89692819	89692920
<i>PTEN</i>	10	89692920	89693032
<i>PTEN</i>	10	89711802	89711928
<i>PTEN</i>	10	89711917	89712018
<i>PTEN</i>	10	89717580	89717695
<i>PTEN</i>	10	89717694	89717792
<i>PTEN</i>	10	89720569	89720688
<i>PTEN</i>	10	89720692	89720768
<i>PTEN</i>	10	89720769	89720842
<i>PTEN</i>	10	89724948	89725061
<i>PTEN</i>	10	89725058	89725147
<i>PTEN</i>	10	89725207	89725320
<i>PTEN</i>	10	89725369	89725483
<i>PTEN</i>	10	89725452	89725525
<i>PTEN</i>	10	89725598	89725686
<i>PTEN</i>	10	89725686	89725789
<i>PTEN</i>	10	89725789	89725894
<i>PTEN</i>	10	89725891	89726013
<i>PTEN</i>	10	89726033	89726151
<i>PTEN</i>	10	89726145	89726257
<i>PTEN</i>	10	89726257	89726375
<i>PTEN</i>	10	89726429	89726551

<i>BRCA1</i>	17	41243903	41244019
<i>BRCA1</i>	17	41244019	41244135
<i>BRCA1</i>	17	41244134	41244251
<i>BRCA1</i>	17	41244251	41244328
<i>BRCA1</i>	17	41244328	41244404
<i>BRCA1</i>	17	41244404	41244501
<i>BRCA1</i>	17	41244501	41244576
<i>BRCA1</i>	17	41244560	41244667
<i>BRCA1</i>	17	41244667	41244779
<i>BRCA1</i>	17	41244779	41244900
<i>BRCA1</i>	17	41244900	41244995
<i>BRCA1</i>	17	41244995	41245096
<i>BRCA1</i>	17	41245096	41245174
<i>BRCA1</i>	17	41245174	41245297
<i>BRCA1</i>	17	41245297	41245381
<i>BRCA1</i>	17	41245381	41245503
<i>BRCA1</i>	17	41245503	41245593
<i>BRCA1</i>	17	41245591	41245690
<i>BRCA1</i>	17	41245690	41245799
<i>BRCA1</i>	17	41245799	41245904
<i>BRCA1</i>	17	41245898	41245969
<i>BRCA1</i>	17	41245957	41246040
<i>BRCA1</i>	17	41246029	41246105
<i>BRCA1</i>	17	41246105	41246185
<i>BRCA1</i>	17	41246170	41246284
<i>BRCA1</i>	17	41246276	41246365
<i>BRCA1</i>	17	41246365	41246487
<i>BRCA1</i>	17	41246487	41246589
<i>BRCA1</i>	17	41246589	41246715
<i>BRCA1</i>	17	41246715	41246821
<i>BRCA1</i>	17	41246821	41246886
<i>BRCA1</i>	17	41247850	41247970
<i>BRCA1</i>	17	41249251	41249367
<i>BRCA1</i>	17	41251679	41251798
<i>BRCA1</i>	17	41251798	41251898
<i>BRCA1</i>	17	41256148	41256265
<i>BRCA1</i>	17	41256220	41256290
<i>BRCA1</i>	17	41256863	41256989
<i>BRCA1</i>	17	41258404	41258520
<i>BRCA1</i>	17	41258520	41258598
<i>BRCA1</i>	17	41267695	41267773
<i>BRCA1</i>	17	41267773	41267878
<i>BRCA1</i>	17	41275976	41276092
<i>BRCA1</i>	17	41276117	41276226
<i>BRCA1</i>	17	41277206	41277288
<i>BRCA1</i>	17	41277288	41277411
<i>BRCA1</i>	17	41277411	41277517

<i>PTEN</i>	10	89726458	89726561
<i>PTEN</i>	10	89726644	89726734
<i>PTEN</i>	10	89726756	89726878
<i>PTEN</i>	10	89726809	89726905
<i>PTEN</i>	10	89726926	89727024
<i>PTEN</i>	10	89727018	89727126
<i>PTEN</i>	10	89727138	89727255
<i>PTEN</i>	10	89727282	89727375
<i>PTEN</i>	10	89727305	89727426
<i>PTEN</i>	10	89727424	89727503
<i>PTEN</i>	10	89727503	89727586
<i>PTEN</i>	10	89727586	89727690
<i>PTEN</i>	10	89727690	89727801
<i>PTEN</i>	10	89727800	89727907
<i>PTEN</i>	10	89727907	89728000
<i>PTEN</i>	10	89728000	89728119
<i>PTEN</i>	10	89728116	89728233
<i>PTEN</i>	10	89728231	89728325
<i>PTEN</i>	10	89728325	89728409
<i>PTEN</i>	10	89728407	89728521
<i>RRM1</i>	11	4115890	4115994
<i>RRM1</i>	11	4115980	4116087
<i>RRM1</i>	11	4116085	4116191
<i>RRM1</i>	11	4116181	4116284
<i>RRM1</i>	11	4123130	4123248
<i>RRM1</i>	11	4123248	4123356
<i>RRM1</i>	11	4127209	4127335
<i>RRM1</i>	11	4127335	4127451
<i>RRM1</i>	11	4128578	4128711
<i>RRM1</i>	11	4130809	4130919
<i>RRM1</i>	11	4130903	4130994
<i>RRM1</i>	11	4132758	4132857
<i>RRM1</i>	11	4132856	4132952
<i>RRM1</i>	11	4133059	4133178
<i>RRM1</i>	11	4133178	4133293
<i>RRM1</i>	11	4139486	4139591
<i>RRM1</i>	11	4139591	4139713
<i>RRM1</i>	11	4141069	4141161
<i>RRM1</i>	11	4142786	4142896
<i>RRM1</i>	11	4142889	4142996
<i>RRM1</i>	11	4143279	4143383
<i>RRM1</i>	11	4143383	4143492
<i>RRM1</i>	11	4144371	4144458
<i>RRM1</i>	11	4144457	4144581
<i>RRM1</i>	11	4144580	4144699
<i>RRM1</i>	11	4147854	4147954
<i>RRM1</i>	11	4147923	4148000

<i>ERCC1</i>	19	45910739	45910856
<i>ERCC1</i>	19	45910856	45910956
<i>ERCC1</i>	19	45911355	45911488
<i>ERCC1</i>	19	45911476	45911599
<i>ERCC1</i>	19	45911596	45911725
<i>ERCC1</i>	19	45911720	45911843
<i>ERCC1</i>	19	45911836	45911958
<i>ERCC1</i>	19	45911957	45912092
<i>ERCC1</i>	19	45912091	45912221
<i>ERCC1</i>	19	45912212	45912331
<i>ERCC1</i>	19	45912329	45912460
<i>ERCC1</i>	19	45912459	45912568
<i>ERCC1</i>	19	45912561	45912684
<i>ERCC1</i>	19	45912669	45912788
<i>ERCC1</i>	19	45912786	45912916
<i>ERCC1</i>	19	45912908	45913007
<i>ERCC1</i>	19	45916886	45917003
<i>ERCC1</i>	19	45917169	45917301
<i>ERCC1</i>	19	45918054	45918180
<i>ERCC1</i>	19	45918180	45918291
<i>ERCC1</i>	19	45920044	45920168
<i>ERCC1</i>	19	45922317	45922436
<i>ERCC1</i>	19	45922435	45922522
<i>ERCC1</i>	19	45923510	45923636
<i>ERCC1</i>	19	45923631	45923712
<i>ERCC1</i>	19	45924350	45924452
<i>ERCC1</i>	19	45924452	45924576
<i>ERCC1</i>	19	45924573	45924702
<i>ERCC1</i>	19	45926526	45926630
<i>ERCC1</i>	19	45926628	45926761
<i>ERCC1</i>	19	45926750	45926829
<i>ERCC1</i>	19	45926988	45927096
<i>ERCC1</i>	19	45927095	45927210
<i>TOP1</i>	20	39657431	39657568
<i>TOP1</i>	20	39657567	39657705
<i>TOP1</i>	20	39657595	39657716
<i>TOP1</i>	20	39658047	39658179
<i>TOP1</i>	20	39690017	39690145
<i>TOP1</i>	20	39704789	39704917
<i>TOP1</i>	20	39704813	39704933
<i>TOP1</i>	20	39706209	39706306
<i>TOP1</i>	20	39708708	39708802
<i>TOP1</i>	20	39708818	39708912
<i>TOP1</i>	20	39709761	39709890
<i>TOP1</i>	20	39713099	39713209
<i>TOP1</i>	20	39721000	39721114
<i>TOP1</i>	20	39721114	39721240

<i>RRM1</i>	11	4148022	4148109
<i>RRM1</i>	11	4148212	4148304
<i>RRM1</i>	11	4148303	4148390
<i>RRM1</i>	11	4148390	4148491
<i>RRM1</i>	11	4150237	4150361
<i>RRM1</i>	11	4153465	4153554
<i>RRM1</i>	11	4153554	4153662
<i>RRM1</i>	11	4154750	4154848
<i>RRM1</i>	11	4154850	4154932
<i>RRM1</i>	11	4156210	4156319
<i>RRM1</i>	11	4156319	4156445
<i>RRM1</i>	11	4156445	4156523
<i>RRM1</i>	11	4159387	4159475
<i>RRM1</i>	11	4159475	4159597
<i>RRM1</i>	11	4159597	4159718
<i>RRM1</i>	11	4159711	4159784
<i>RRM1</i>	11	4159866	4159969
<i>RRM1</i>	11	4159948	4160022
<i>RRM1</i>	11	4160051	4160167
<i>KRAS</i> 3. ekson	12	25380167	25380240
<i>KRAS</i> 3. ekson	12	25380240	25380358
<i>KRAS</i> 2. ekson	12	25398183	25398304
<i>KRAS</i> 2. ekson	12	25398304	25398379
<i>ERBB3</i>	12	56473748	56473885
<i>ERBB3</i>	12	56473860	56473950
<i>ERBB3</i>	12	56473949	56474069
<i>ERBB3</i>	12	56474069	56474166
<i>ERBB3</i>	12	56477495	56477589
<i>ERBB3</i>	12	56477589	56477705
<i>ERBB3</i>	12	56478754	56478880
<i>ERBB3</i>	12	56478880	56478965
<i>ERBB3</i>	12	56478963	56479094
<i>ERBB3</i>	12	56479094	56479234
<i>ERBB3</i>	12	56480312	56480441
<i>ERBB3</i>	12	56481328	56481455
<i>ERBB3</i>	12	56481572	56481702
<i>ERBB3</i>	12	56481739	56481866
<i>ERBB3</i>	12	56481866	56481948
<i>ERBB3</i>	12	56482322	56482449
<i>ERBB3</i>	12	56482527	56482652
<i>ERBB3</i>	12	56486521	56486630
<i>ERBB3</i>	12	56486748	56486880
<i>ERBB3</i>	12	56487109	56487215
<i>ERBB3</i>	12	56487215	56487334
<i>ERBB3</i>	12	56487504	56487631
<i>ERBB3</i>	12	56487631	56487723

<i>TOP1</i>	20	39725802	39725905
<i>TOP1</i>	20	39725905	39725983
<i>TOP1</i>	20	39726790	39726917
<i>TOP1</i>	20	39726917	39726995
<i>TOP1</i>	20	39728662	39728773
<i>TOP1</i>	20	39728773	39728884
<i>TOP1</i>	20	39729771	39729868
<i>TOP1</i>	20	39729868	39729993
<i>TOP1</i>	20	39741389	39741490
<i>TOP1</i>	20	39741490	39741590
<i>TOP1</i>	20	39742572	39742692
<i>TOP1</i>	20	39742692	39742798
<i>TOP1</i>	20	39744048	39744126
<i>TOP1</i>	20	39744910	39745038
<i>TOP1</i>	20	39746717	39746816
<i>TOP1</i>	20	39746816	39746938
<i>TOP1</i>	20	39750319	39750445
<i>TOP1</i>	20	39750582	39750672
<i>TOP1</i>	20	39750672	39750796
<i>TOP1</i>	20	39751741	39751837
<i>TOP1</i>	20	39751837	39751956
<i>TOP1</i>	20	39751955	39752085
<i>TOP1</i>	20	39752085	39752210
<i>TOP1</i>	20	39752209	39752296
<i>TOP1</i>	20	39752296	39752415
<i>TOP1</i>	20	39752394	39752514
<i>TOP1</i>	20	39752514	39752626
<i>TOP1</i>	20	39752743	39752822
<i>TOP1</i>	20	39752768	39752837
<i>TOP1</i>	20	39753016	39753118
<i>TOP1</i>	20	39753025	39753141
<i>SCD4</i> 4. ekson	20	43958984	43959085
<i>SCD4</i> 4. ekson	20	43959085	43959215
<i>SCD4</i> 2. ekson	20	43964316	43964438
<i>SCD4</i> 2. ekson	20	43964438	43964561
<i>NR3C4</i>	X	66763848	66763982
<i>NR3C4</i>	X	66763979	66764106
<i>NR3C4</i>	X	66764047	66764152
<i>NR3C4</i>	X	66764335	66764458
<i>NR3C4</i>	X	66764457	66764552
<i>NR3C4</i>	X	66764552	66764665
<i>NR3C4</i>	X	66764665	66764789
<i>NR3C4</i>	X	66764789	66764910
<i>NR3C4</i>	X	66764910	66765000
<i>NR3C4</i>	X	66764996	66765085
<i>NR3C4</i>	X	66765276	66765370

<i>ERBB3</i>	12	56487853	56487982
<i>ERBB3</i>	12	56488164	56488291
<i>ERBB3</i>	12	56488291	56488389
<i>ERBB3</i>	12	56488999	56489129
<i>ERBB3</i>	12	56489412	56489517
<i>ERBB3</i>	12	56489511	56489626
<i>ERBB3</i>	12	56490283	56490409
<i>ERBB3</i>	12	56490515	56490645
<i>ERBB3</i>	12	56490804	56490929
<i>ERBB3</i>	12	56490929	56491015
<i>ERBB3</i>	12	56491527	56491644
<i>ERBB3</i>	12	56491644	56491759
<i>ERBB3</i>	12	56492281	56492367
<i>ERBB3</i>	12	56492479	56492602
<i>ERBB3</i>	12	56492602	56492692
<i>ERBB3</i>	12	56493398	56493530
<i>ERBB3</i>	12	56493594	56493713
<i>ERBB3</i>	12	56493713	56493822
<i>ERBB3</i>	12	56493915	56494045
<i>ERBB3</i>	12	56494818	56494943
<i>ERBB3</i>	12	56494933	56495052
<i>ERBB3</i>	12	56495046	56495150
<i>ERBB3</i>	12	56495277	56495359
<i>ERBB3</i>	12	56495359	56495464
<i>ERBB3</i>	12	56495464	56495588
<i>ERBB3</i>	12	56495588	56495680
<i>ERBB3</i>	12	56495680	56495783
<i>ERBB3</i>	12	56495783	56495888
<i>ERBB3</i>	12	56495888	56495973
<i>ERBB3</i>	12	56495973	56496088
<i>ERBB3</i>	12	56496088	56496205
<i>ERBB3</i>	12	56496205	56496302
<i>ERBB3</i>	12	56496723	56496837
<i>ERBB3</i>	12	56496836	56496965
<i>ERBB3</i>	12	56496965	56497052
<i>ERBB3</i>	12	56497052	56497157
<i>ERBB3</i>	12	56497157	56497282
<i>ERBB3</i>	12	56497282	56497355
<i>LRIG3 16. ekson</i>	12	59270181	59270286
<i>LRIG3 16. ekson</i>	12	59270286	59270394
<i>ERBB2</i>	17	37844323	37844449
<i>ERBB2</i>	17	37844449	37844532
<i>ERBB2</i>	17	37844979	37845109
<i>ERBB2</i>	17	37851189	37851315
<i>ERBB2</i>	17	37851312	37851435
<i>ERBB2</i>	17	37856196	37856334
<i>ERBB2</i>	17	37856537	37856669

<i>NR3C4</i>	X	66765339	66765467
<i>NR3C4</i>	X	66765460	66765579
<i>NR3C4</i>	X	66765578	66765701
<i>NR3C4</i>	X	66765701	66765803
<i>NR3C4</i>	X	66765803	66765933
<i>NR3C4</i>	X	66765933	66766028
<i>NR3C4</i>	X	66766028	66766158
<i>NR3C4</i>	X	66766158	66766294
<i>NR3C4</i>	X	66766291	66766428
<i>NR3C4</i>	X	66766423	66766531
<i>NR3C4</i>	X	66766531	66766659
<i>NR3C4</i>	X	66788662	66788785
<i>NR3C4</i>	X	66788785	66788895
<i>NR3C4</i>	X	66863058	66863154
<i>NR3C4</i>	X	66863154	66863249
<i>NR3C4</i>	X	66905814	66905937
<i>NR3C4</i>	X	66905937	66906046
<i>NR3C4</i>	X	66931239	66931351
<i>NR3C4</i>	X	66931351	66931456
<i>NR3C4</i>	X	66931453	66931544
<i>NR3C4</i>	X	66937288	66937420
<i>NR3C4</i>	X	66937420	66937534
<i>NR3C4</i>	X	66941587	66941717
<i>NR3C4</i>	X	66941717	66941847
<i>NR3C4</i>	X	66942664	66942786
<i>NR3C4</i>	X	66942785	66942863
<i>NR3C4</i>	X	66943502	66943616
<i>NR3C4</i>	X	66943616	66943736
<i>NR3C4</i>	X	66943736	66943815
<i>NR3C4</i>	X	66943815	66943924
<i>NR3C4</i>	X	66943924	66944007
<i>NR3C4</i>	X	66943998	66944073
<i>NR3C4</i>	X	66944263	66944356
<i>NR3C4</i>	X	66944353	66944474
<i>NR3C4</i>	X	66944452	66944562
<i>NR3C4</i>	X	66944559	66944677
<i>NR3C4</i>	X	66944677	66944807
<i>NR3C4</i>	X	66944807	66944892
<i>NR3C4</i>	X	66944892	66945004
<i>NR3C4</i>	X	66945004	66945110
<i>NR3C4</i>	X	66945110	66945222
<i>NR3C4</i>	X	66945220	66945317
<i>NR3C4</i>	X	66945317	66945432
<i>NR3C4</i>	X	66945432	66945556
<i>NR3C4</i>	X	66945556	66945638
<i>NR3C4</i>	X	66945638	66945731
<i>NR3C4</i>	X	66945731	66945849

<i>ERBB2</i>	17	37863230	37863367
<i>ERBB2</i>	17	37863364	37863452
<i>ERBB2</i>	17	37864562	37864693
<i>ERBB2</i>	17	37864687	37864793
<i>ERBB2</i>	17	37865556	37865639
<i>ERBB2</i>	17	37865639	37865730
<i>ERBB2</i>	17	37866026	37866154
<i>ERBB2</i>	17	37866336	37866468
<i>ERBB2</i>	17	37866536	37866660
<i>ERBB2</i>	17	37866660	37866755
<i>ERBB2</i>	17	37868166	37868258
<i>ERBB2</i>	17	37868258	37868376
<i>ERBB2</i>	17	37868529	37868642
<i>ERBB2</i>	17	37868642	37868741
<i>ERBB2</i>	17	37871506	37871591
<i>ERBB2</i>	17	37871591	37871695
<i>ERBB2</i>	17	37871678	37871811
<i>ERBB2</i>	17	37871983	37872101
<i>ERBB2</i>	17	37872100	37872192
<i>ERBB2</i>	17	37872549	37872688
<i>ERBB2</i>	17	37872762	37872875
<i>ERBB2</i>	17	37873520	37873642
<i>ERBB2</i>	17	37873621	37873733
<i>ERBB2</i>	17	37875997	37876133
<i>ERBB2</i>	17	37879552	37879680
<i>ERBB2</i>	17	37879679	37879816
<i>ERBB2</i>	17	37879812	37879913
<i>ERBB2</i>	17	37880155	37880283
<i>ERBB2</i>	17	37880960	37881074
<i>ERBB2</i>	17	37881074	37881206
<i>ERBB2</i>	17	37881291	37881372
<i>ERBB2</i>	17	37881372	37881458
<i>ERBB2</i>	17	37881519	37881644
<i>ERBB2</i>	17	37881644	37881745
<i>ERBB2</i>	17	37881853	37881965
<i>ERBB2</i>	17	37881965	37882094
<i>ERBB2</i>	17	37882094	37882180
<i>ERBB2</i>	17	37882729	37882858
<i>ERBB2</i>	17	37882858	37882974
<i>ERBB2</i>	17	37882994	37883121
<i>ERBB2</i>	17	37883120	37883256
<i>ERBB2</i>	17	37883515	37883644
<i>ERBB2</i>	17	37883644	37883751
<i>ERBB2</i>	17	37883732	37883813
<i>ERBB2</i>	17	37883928	37884059

<i>NR3C4</i>	X	66945849	66945954
<i>NR3C4</i>	X	66945954	66946046
<i>NR3C4</i>	X	66946046	66946168
<i>NR3C4</i>	X	66946233	66946340
<i>NR3C4</i>	X	66946360	66946457
<i>NR3C4</i>	X	66946456	66946552
<i>NR3C4</i>	X	66946552	66946674
<i>NR3C4</i>	X	66946674	66946783
<i>NR3C4</i>	X	66946783	66946895
<i>NR3C4</i>	X	66946895	66947012
<i>NR3C4</i>	X	66947003	66947080
<i>NR3C4</i>	X	66947097	66947210
<i>NR3C4</i>	X	66947210	66947319
<i>NR3C4</i>	X	66947276	66947392
<i>NR3C4</i>	X	66947392	66947518
<i>NR3C4</i>	X	66947516	66947598
<i>NR3C4</i>	X	66947598	66947676
<i>NR3C4</i>	X	66947674	66947792
<i>NR3C4</i>	X	66947792	66947905
<i>NR3C4</i>	X	66947905	66947990
<i>NR3C4</i>	X	66947988	66948098
<i>NR3C4</i>	X	66948098	66948213
<i>NR3C4</i>	X	66948213	66948337
<i>NR3C4</i>	X	66948337	66948460
<i>NR3C4</i>	X	66948493	66948580
<i>NR3C4</i>	X	66948579	66948655
<i>NR3C4</i>	X	66948655	66948750
<i>NR3C4</i>	X	66948750	66948865
<i>NR3C4</i>	X	66948865	66948982
<i>NR3C4</i>	X	66948982	66949098
<i>NR3C4</i>	X	66949097	66949207
<i>NR3C4</i>	X	66949207	66949316
<i>NR3C4</i>	X	66949315	66949392
<i>NR3C4</i>	X	66949387	66949496
<i>NR3C4</i>	X	66949496	66949575
<i>NR3C4</i>	X	66949575	66949704
<i>NR3C4</i>	X	66949704	66949799
<i>NR3C4</i>	X	66949794	66949873
<i>NR3C4</i>	X	66949873	66949956
<i>NR3C4</i>	X	66949955	66950077
<i>NR3C4</i>	X	66950059	66950150
<i>NR3C4</i>	X	66950143	66950275
<i>NR3C4</i>	X	66950271	66950378
<i>NR3C4</i>	X	66950378	66950501

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Freddy Lättekivi (sünnikuupäev: 11.09.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Liposarkoomi genoomipiirkondade sekveneerimine, mille juhendajad on Ene Reimann ja Ants Kurg,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014